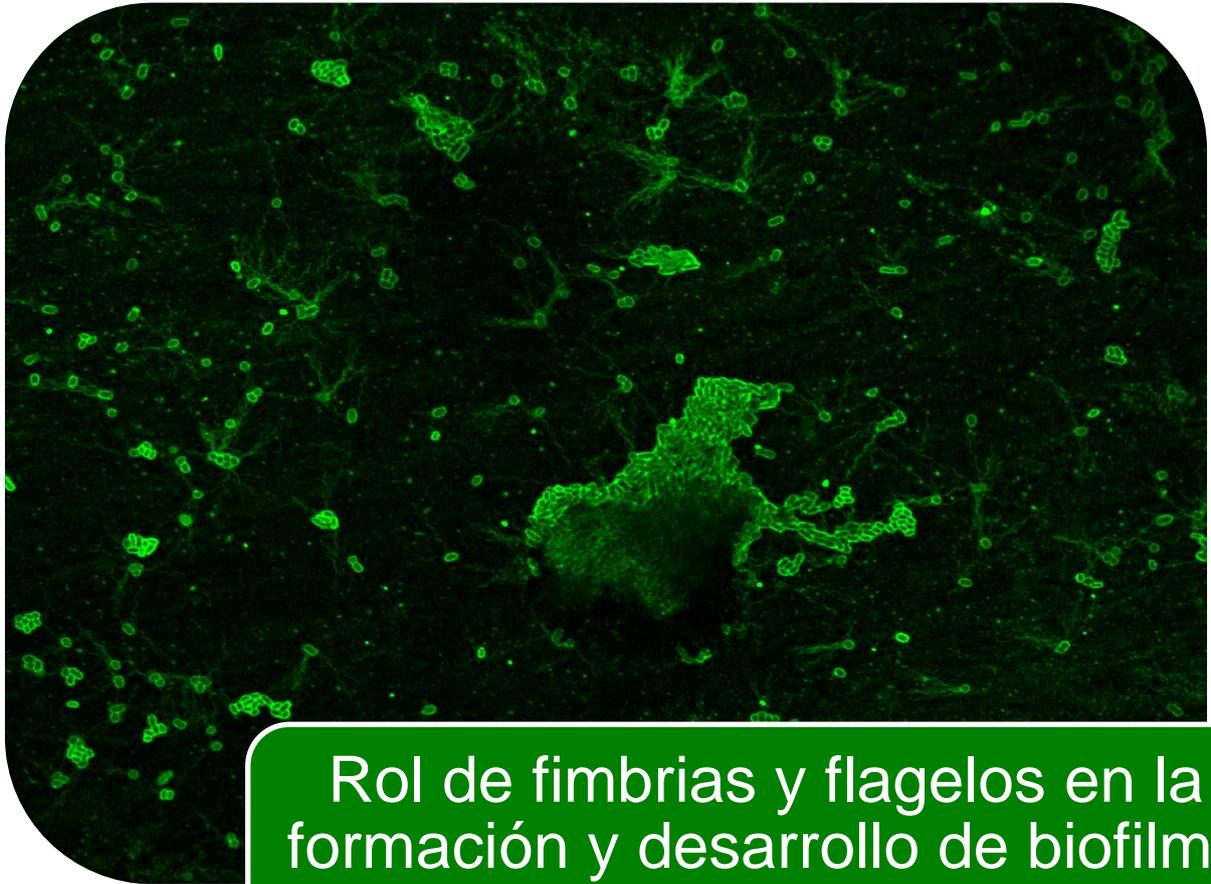


Universidad de la República

Facultad de Ciencias

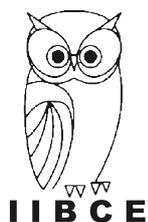


**Rol de fimbrias y flagelos en la
formación y desarrollo de biofilms
de *Proteus mirabilis* uropatógeno**

**Tesina de graduación
Licenciatura en Bioquímica**

Bach. Virginia Baráibar

Tutora: Mag. Paola Scavone



Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Departamento de Microbiología
Montevideo, 2012

ÍNDICE

Agradecimientos	4
Abreviaturas	5
Resumen	6
Introducción	8
1. Biofilms: definición y estructura	8
2. Rol biológico e importancia	9
2.1 Protección frente al ambiente	10
2.2 Disponibilidad de nutrientes y cooperación metabólica	11
2.3 Adquisición de nuevas características genéticas	11
3. Etapas de formación	13
3.1 Adhesión inicial	14
3.2 Formación de microcolonias	17
3.3 Maduración	18
3.4 Dispersión.....	19
4. Relación entre la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas	20
5. Infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITU-c).....	22
5.1 Patogénesis	24
5.2 <i>Proteus mirabilis</i>	26
5.3 Adhesinas	27
5.4 Movilidad mediada por flagelos.....	28
5.5 Formación de biofilms.....	29
6. Microscopía láser confocal como herramienta para el estudio de biofilms	31
Hipótesis y objetivos	33
Materiales y métodos	34
1. Cepas bacterianas y medios de cultivo.....	34
2. Análisis del crecimiento de <i>P. mirabilis</i> en orina artificial	36
3. Evaluación del papel de flagelos y fimbrias en la formación y desarrollo de biofilms de <i>P. mirabilis</i> uropatogénico	37
3.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana.....	37

3.2 Determinación de la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas ..	38
4. Caracterización de la formación y arquitectura de biofilms de <i>P. mirabilis</i>	
uropatogénico	39
4.1 Formación de biofilms <i>in vitro</i>	39
4.2 Inmunofluorescencia <i>in situ</i> de biofilms	40
4.3 Análisis de la estructura tridimensional de los biofilms mediante MLC	40
4.4 Procesamiento de imágenes obtenidas mediante MLC.....	41
4.4.1 Deconvolución de imágenes	41
4.4.2 Segmentación de imágenes	41
4.4.3 Cálculo de parámetros y reconstrucción de modelos 3D de biofilms.....	42
5. Análisis estadístico	43
Resultados	44
1. Análisis del crecimiento de <i>P. mirabilis</i> en orina artificial	44
2. Evaluación del papel de flagelos y fimbrias en la formación y desarrollo de biofilms de <i>P. mirabilis</i> uropatogénico	45
2.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana	45
2.2 Determinación de la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas ..	51
3. Caracterización de la formación y arquitectura de biofilms de <i>P. mirabilis</i>	
uropatogénico.....	54
3.1 Cálculo de parámetros.....	54
3.1.1 Número de bacterias.....	54
3.1.2 Volumen total de bacterias	58
3.1.3 Volumen total cubierto	62
3.2 Construcción de modelos 3D de biofilms	65
Discusión.....	70
Conclusiones y perspectivas.....	81
Referencias	82

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Pablo Zunino, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.
- ❖ A mis padres, por su apoyo incondicional.
- ❖ A mis hermanas, mis tías y mis abuelos, por estar siempre conmigo.
- ❖ A Joaquín, por su cariño y su paciencia.
- ❖ A Pao y mis amigos del liceo.
- ❖ A Diego, Anita, Lu, Fran, Lula, Fio, Magui y todos mis amigos de Ciencias.
- ❖ A Ana Umpiérrez, siempre dispuesta a enseñarme y ayudarme; a Germán Pérez, gracias a quien llegué al IIBCE, y a toda la colonia.
- ❖ A Marcela Díaz, por su ayuda con el microscopio confocal.
- ❖ Y sobre todo a mi tutora Paola Scavone, por el tiempo y la paciencia que me dedicó no sólo como estudiante sino como persona.

ABREVIATURAS

CV	Cristal violeta
DO	Densidad óptica
FIT-C	Isotiocianato de fluoresceína
ITU	Infección del tracto urinario
ITU-c	Infección del tracto urinario asociada a catéteres
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
EPS	Exopolisacáridos
MLC	Microscopía láser confocal
MR/P	Fimbria Mannose resistant <i>Proteus</i> -like
OA	Orina artificial
PBS	Solución tampón salina fosfatada
PMF	Fimbria <i>Proteus mirabilis</i>
UCA	Fimbria <i>Uroepithelial Cell Adherence</i>

RESUMEN

Los biofilms son comunidades microbianas compuestas por células unidas irreversiblemente a un sustrato, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia. Estas comunidades pueden estar formadas por una o múltiples especies bacterianas y son capaces de formarse sobre una amplia variedad de superficies.

Queda claro a partir de evidencia epidemiológica que los biofilms se asocian a numerosas enfermedades infecciosas. El proceso puede ser particularmente relevante en el caso de pacientes inmunocomprometidos, que son incapaces de combatir microorganismos invasores.

Los catéteres urinarios son dispositivos médicos tubulares de uso común en hospitales y casas de salud, que se insertan a través de la uretra hasta la vejiga. Debido al uso frecuente y muchas veces innecesario de catéteres urinarios, muchas personas son puestas en riesgo de sufrir complicaciones asociadas al uso de estos dispositivos, siendo la más notable el desarrollo de infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres. Las ITU-c suelen ser recurrentes como consecuencia del desarrollo de biofilms cristalinos en los catéteres y resultan en morbilidad a largo plazo. Este tipo de infecciones no sólo son significativas debido a su alta incidencia y costo económico resultante, sino también a las severas consecuencias que pueden provocar.

Proteus mirabilis es un patógeno oportunista Gram negativo que causa infecciones del tracto urinario, generalmente complicadas. *P. mirabilis* es capaz de formar biofilms en catéteres urinarios. Diversos tipos de fimbrias y los flagelos estarían vinculados a la adhesión y movilidad bacteriana respectivamente, por lo que podrían asociarse a la formación de biofilms.

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la formación, arquitectura y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis* y evaluar el papel de flagelos y fimbrias, factores potencialmente asociados con su urovirulencia.

Por un lado se evaluó el desarrollo temporal de biofilms de *P. mirabilis* uropatogénico empleando microscopía láser confocal y procesamiento de imágenes. Por otro lado se determinó el papel de flagelos y fimbrias en la

formación de biofilms utilizando mutantes isogénicas incapaces de expresar estos factores.

Los resultados permitieron determinar que el medio en el que es cultivado *P. mirabilis* afectaría su crecimiento y propiedades tales como la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y la capacidad de adhesión a distintas superficies. A pesar de que individualmente no serían indispensables para la formación de los biofilms, tanto los flagelos como los distintos tipos de fimbrias de *P. mirabilis* cumplirían una función en la formación de sus biofilms, posiblemente afectando su estructura y estabilidad.

INTRODUCCIÓN

1. Biofilms: definición y estructura

Los biofilms se definen como comunidades microbianas que se componen por células unidas irreversiblemente a un sustrato, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia. Los microorganismos que forman parte de estas comunidades exhiben un fenotipo alterado con respecto al ritmo de crecimiento y la transcripción génica (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms pueden estar compuestos por una o múltiples especies bacterianas y son capaces de formarse sobre una amplia variedad de superficies bióticas y abióticas, así como en interfases aire-líquido (Adal & Farr, 1996; Archibald & Gaynes, 1997; Dickinson & Bisno, 1993). Aunque los biofilms formados por múltiples especies son más habituales en la naturaleza, los que constan de una sola especie revisten un interés particular debido a su importancia clínica. Estos últimos pueden desarrollarse tanto en implantes médicos como en tejidos, contribuyendo de esta manera a una variedad de infecciones persistentes (Costerton et al., 1999).

Uno de los componentes esenciales de este micronicho es la matriz que lo rodea, la que está compuesta mayormente por exopolisacáridos (EPS) y en menor medida por proteínas y ADN. Se cree que este último podría ayudar a mantener unidos entre sí a los componentes del biofilm (The mob response). En la matriz también pueden hallarse componentes no celulares como cristales minerales, partículas de cieno o arcilla, o componentes sanguíneos, dependiendo del ambiente en el que se desarrolle el biofilm (Donlan, 2002).

En el caso de las bacterias Gram negativas, algunos de los polisacáridos que forman parte del EPS son neutros o polianiónicos (Donlan, 2002). Esta propiedad es importante porque permite la asociación con cationes divalentes

como calcio y magnesio, los cuales se entrecruzan con las hebras de polímero y proveen una mayor fuerza de unión en un biofilm desarrollado (Flemming et al., 2000).

El EPS está altamente hidratado, ya que puede incorporar grandes cantidades de agua a su estructura mediante puentes de hidrógeno. Esta propiedad evita en general la desecación de biofilms naturales (Donlan, 2002). Normalmente, el EPS de los biofilms no es uniforme, sino que varía en tiempo y espacio. Por ejemplo, la producción de EPS se ve afectada por la disponibilidad de nutrientes en el medio de crecimiento. Factores como el exceso de carbono y la escasez de nitrógeno, potasio o fosfato promueven la síntesis de EPS (Sutherland, 2001).

2. Rol biológico e importancia

Los biofilms están implicados en numerosas enfermedades (a menudo crónicas) como fibrosis quística, tuberculosis, sinusitis y algunos tipos de enfermedad cardíaca (The mob response). Asimismo, se asocian a problemas en otros ámbitos, como contaminación de alimentos y suministros de agua. Sin embargo, en algunos casos son beneficiosos: tienen un rol esencial en el tratamiento de aguas residuales y en la decontaminación de ambientes, además de ser vitales para la salud de los ecosistemas (The mob response). En ríos y arroyos, las comunidades bacterianas absorben iones pesados del agua y degradan los residuos orgánicos de plantas y peces muertos; los biofilms que se forman en la superficie pueden incluso cumplir esta función sin consumir oxígeno adicional (The mob response).

Independientemente de sus características fisiológicas, gran parte de los microorganismos parece ser capaz de hacer la transición a la vida en superficie (O'Toole et al., 2000); de hecho, la observación directa de una gran variedad de ambientes naturales ha permitido determinar que la mayoría de los microorganismos no vive independientemente, sino que se encuentra adherida a superficies formando biofilms estructurados (Costerton et al., 1995). El hecho

de que los biofilms estén tan extendidos en ambientes naturales sugiere que la vida en grupo es esencial para la evolución y ecología bacteriana (Hall-Stoodley et al., 2004). Esta forma de vida ofrece ventajas concretas a los microorganismos, como protección frente al ambiente, disponibilidad de nutrientes, cooperación metabólica, y posibilidad de adquirir nueva información genética.

2.1 Protección frente al ambiente

Los biofilms protegen a los microorganismos de ciertas condiciones adversas del ambiente. La matriz confiere estabilidad estructural a los biofilms y contribuye a la notable resistencia que presentan los mismos a los antibióticos, al sistema inmune del hospedero y a muchos otros compuestos utilizados con el objetivo de eliminarlos de alimentos, maquinaria o implantes médicos contaminados (The mob response).

La matriz tiene la capacidad de impedir físicamente el acceso de determinados agentes antimicrobianos al biofilm ya que actúa como un intercambiador de iones y restringe la difusión de compuestos desde el ambiente al interior del mismo (Gilbert et al, 1997). Esta característica está vinculada en gran medida tanto a la naturaleza del agente antimicrobiano como a la de la matriz, la resistencia parece ser máxima en el caso de antibióticos hidrofílicos cargados positivamente, como los aminoglicósidos (Nichols et al., 1988; Nichols et al., 1989; Nickel et al., 1985). Se ha comprobado también que el EPS es capaz de retener metales, cationes y toxinas (Decho, 1990; Flemming, 1993), y que protegería a los microorganismos de una variedad de condiciones ambientales adversas, como radiación ultravioleta, cambios de pH, shock osmótico y desecación (Flemming, 1993).

2.2 Disponibilidad de nutrientes y cooperación metabólica

Las características metabólicas de las bacterias que forman parte de un biofilm son diferentes de las que llevan una vida planctónica. La elaborada arquitectura de los biofilms permite la cooperación metabólica, así como la formación de nichos. En consecuencia, las bacterias que se encuentran dentro de un biofilm están expuestas a una gama de distintas señales ambientales (Davey & O'Toole, 2000).

Los canales que se encuentran dispersos a través del biofilm en las áreas que rodean las microcolonias son una parte esencial de su estructura y función, y estarían involucrados tanto en la formación como en el mantenimiento de los mismos. Se ha demostrado que el líquido fluye a través de estos canales, permitiendo un intercambio efectivo de nutrientes y metabolitos entre los microorganismos y el fluido, aumentando la disponibilidad de nutrientes así como la eliminación de metabolitos potencialmente tóxicos (Costerton et al., 1995; Davey & O'Toole, 2000; Stoodley et al., 1994; Costerton, 1995)

2.3 Adquisición de nuevas características genéticas

La transferencia horizontal de genes es importante para la evolución y diversidad genética de comunidades microbianas naturales. La conjugación es un mecanismo probable de transferencia de genes dentro o entre poblaciones de bacterias que forman biofilms (Davey & O'Toole, 2000).

Los biofilms constituyen un nicho ideal para el intercambio de ADN extracromosómico. La conjugación ocurre a una frecuencia mayor entre células que forman parte de un biofilm que entre células planctónicas (Ehlers & Bower, 1999; Roberts et al., 1999; Hausner & Wuertz, 1999). Una posible explicación para este aumento en los eventos de conjugación es que el biofilm provee un ambiente protegido y de mayor contacto entre las células bacterianas (Donlan, 2002). Se ha sugerido que cepas bacterianas de relevancia clínica que poseen plásmidos conjugativos desarrollan biofilms con mayor facilidad que las cepas que no los poseen (Ghigo, 2001). Ghigo

demonstró que el pilus conjugativo F (codificado por el operon *tra* del plásmido F) actúa como un factor de adhesión tanto para las interacciones célula-célula como para las interacciones célula-superficie en *Escherichia coli*, dando como resultado un biofilm tridimensional (Ghigo, 2001). También se ha comprobado que las cepas portadoras de plásmidos les transfieren los mismos a organismos receptores, lo que tiene como resultado la formación de un biofilm. Sin los plásmidos, los mismos organismos sólo forman microcolonias que no muestran mayor desarrollo (Donlan, 2002). Debido a que los plásmidos pueden incluir genes de resistencia a distintos agentes antimicrobianos, la formación de biofilms también provee un mecanismo de selección de cepas resistentes y favorece su diseminación (Donlan, 2002).

3. Etapas de formación

La formación de un biofilm es un proceso altamente regulado, el cual resulta en una población compleja. Aunque existen muchos patrones especie específicos que reflejan los requerimientos únicos de cada microorganismo, algunos conceptos generales son aplicables al proceso de formación de la mayoría de los biofilms bacterianos (O'Toole et al., 2000). El proceso de desarrollo de un biofilm se puede dividir en 5 etapas claras (Fig. 1) (Hall-Stoodley et al., 2004; Schlapp, 2009):

- i. Aproximación y adhesión inicial reversible.
- ii. Adhesión robusta irreversible y producción de EPS.
- iii. Formación de microcolonias.
- iv. Maduración.
- v. Dispersión.

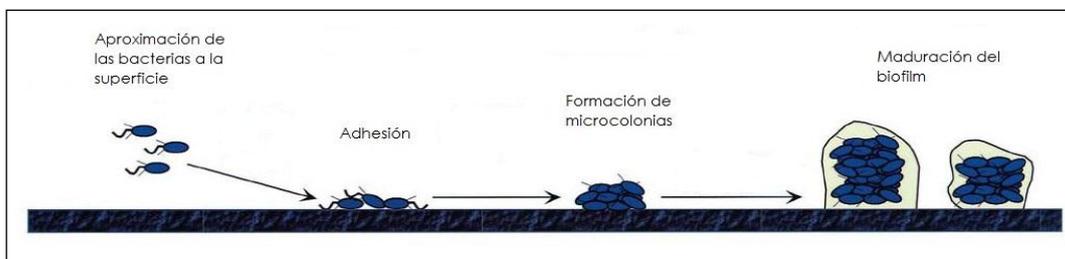


Figura 1: Etapas de formación de un biofilm (extraído de Schlapp, 2009; modificado desde Davey & O'Toole, 2000)

3.1 Adhesión inicial

Los microorganismos poseen múltiples vías genéticas que regulan el desarrollo de biofilms, lo que evidencia la complejidad de las señales que regulan este proceso (O'Toole et al., 2000). Se han logrado identificar componentes estructurales y sistemas de censado que son necesarios para la formación del biofilm. Las bacterias deben ser capaces de unirse a superficies y moverse sobre ellas, detectar su densidad celular y en última instancia formar una estructura celular tridimensional recubierta en EPS (O'Toole et al., 2000).

Se cree que el proceso comienza cuando las bacterias detectan determinadas condiciones ambientales que disparan la transición del crecimiento planctónico a la vida sobre una superficie (Fletcher & Pringle, 1986; Nyvad & Kilian, 1990; O'Toole et al., 2000; O'Toole & Kolter, 1998; Poulsen et al., 1993; Wang et al., 1996). Los factores ambientales que controlan esta transición varían enormemente de un microorganismo a otro, pero pueden incluir disponibilidad de nutrientes, osmolaridad, pH, disponibilidad de hierro, presión de oxígeno y temperatura (Nyvad & Kilian, 1990; O'Toole & Kolter, 1998; Fletcher, 1996; O'Toole & Kolter, 1998; Pratt & Kolter, 1998). Aunque los detalles de las señales ambientales que desencadenan el desarrollo de un biofilm no son las mismas para todos los microorganismos, es claro que las condiciones del medio tienen un profundo impacto en la transición del crecimiento planctónico al del biofilm (Davey & O'Toole, 2000).

La adhesión inicial suele ser reversible, de modo que las células pueden desprenderse de la superficie en caso de que cambien las condiciones (Nadell et al., 2008). Algunas bacterias también pueden posicionarse utilizando pili extracelulares, que actúan como pequeños ganchos y permiten que las células se muevan una sobre otra (Klausen et al., 2003) o a lo largo de una superficie sólida (O'Toole & Kolter, 1998). Algunas especies bacterianas logran adherirse a las superficies en forma más estable mediante moléculas de adhesión específicas (Hinsa et al., 2003; Latasa et al., 2005).

La adhesión es un proceso muy complejo, ya que depende de muchas variables, como el tipo de sustrato y las propiedades de las células bacterianas.

Varias características de la superficie son importantes para el proceso de adhesión. La rugosidad de la superficie favorecería la colonización microbiana, lo que podría deberse a que las fuerzas de corte (*shear forces*) son menores, y el área de superficie es mayor (Characklis et al., 1990).

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también pueden influir en la velocidad y el alcance de la adhesión. Varios investigadores han observado que los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies no polares como el Teflon y otros plásticos que a materiales hidrofílicos como vidrio o metales (Fletcher et al., 1979; Pringle et al., 1983; Bendinger et al., 1993). A pesar de que en ciertas ocasiones los resultados de estos estudios son contradictorios, al parecer existiría cierto grado de interacción hidrofóbica entre la superficie bacteriana y el sustrato, la cual permitiría que la bacteria supere las fuerzas de repulsión que son activas a determinada distancia de la superficie del sustrato y se adhiera irreversiblemente (Donlan, 2002).

Otro factor capaz de afectar la adhesión microbiana es la capa de moléculas que recubre el sustrato (*conditioning film*). Dicha capa se forma ya que inevitablemente una superficie expuesta a un medio acuoso se recubrirá de polímeros propios de ese medio; la modificación química resultante afectará la velocidad y el alcance de la adhesión microbiana. En el caso de superficies expuestas en el cuerpo humano, se ha observado que fluidos producidos por el hospedero como sangre, lágrimas, orina, saliva, fluido intersticial y secreciones respiratorias influyen en la adhesión de las bacterias a los biomateriales (Mittelman, 1996).

Tanto la hidrofobicidad de la superficie celular como la presencia de fimbrias y flagelos y la producción de EPS influyen en la velocidad y extensión de la adhesión de las células microbianas.

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana juega un papel importante en la adhesión debido a que cuanto menos polar es una o ambas superficies involucradas, mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas tienden a establecerse. A pesar de estar cargadas negativamente, la mayoría de las bacterias contienen componentes hidrofóbicos en su superficie (Rosenberg &

Kjelleberg, 1986). Las fimbrias son apéndices no flagelares que no están involucrados en la transferencia de ácidos nucleicos. La mayoría de las fimbrias estudiadas hasta el momento contienen un alto porcentaje de residuos aminoacídicos hidrofóbicos, por lo que contribuyen a la hidrofobicidad total de la superficie bacteriana (Rosenberg & Kjelleberg, 1986). Se cree que el papel que juegan las fimbrias en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y en la adhesión está relacionado con la capacidad de vencer la repulsión electrostática inicial que existe entre la bacteria y el sustrato (Corpe, 1980). Asimismo, se ha observado que las fimbrias también estarían involucradas en la adhesión bacteriana a células eucariotas (Corpe, 1980).

Existen otras propiedades celulares que facilitarían la adhesión. Varios estudios han demostrado que el tratamiento de células adsorbidas a una superficie con enzimas proteolíticas causa un marcado desprendimiento de las bacterias adheridas, lo que aporta evidencia del rol de las proteínas en la adhesión (Bashan & Levanony, 1988; Danielsson et al., 1977).

Para estudiar el papel de los flagelos en la adhesión, Korbelt y colaboradores (Korbelt et al., 1989) utilizaron cepas móviles y no móviles de *P. fluorescens* con el objetivo de demostrar que las células móviles se adhieren en grandes números contra la corriente de flujo y a mayor velocidad que las cepas no móviles. Las cepas no móviles, además, no recolonizan ni se adhieren a áreas vacías sobre un sustrato de forma tan pareja como lo hacen las cepas móviles, lo que resulta en una formación más lenta del biofilm en el caso de los organismos no móviles. Los flagelos jugarían un rol importante en los estadios tempranos de la adhesión bacteriana, ya que al igual que las fimbrias permitirían vencer las fuerzas repulsivas asociadas al sustrato.

Teniendo en cuenta estas observaciones, se puede concluir que las estructuras de la superficie bacteriana como las fimbrias, proteínas, lipopolisacáridos (LPS), EPS y los flagelos claramente tienen un papel importante en el proceso de adhesión. Los polímeros de la superficie bacteriana que contienen sitios hidrofóbicos, tales como las fimbrias, algunas proteínas y componentes de determinadas bacterias Gram positivas dominarían la adhesión a sustratos

hidrofóbicos, mientras que el EPS y el LPS son más importantes en la unión a materiales hidrofílicos (Donlan, 2002).

En resumen, la adhesión bacteriana suele verse favorecida por la rugosidad e hidrofobicidad del sustrato, así como por la presencia de *conditioning films*. Aumentos en la velocidad de flujo, la temperatura del agua o concentración de nutrientes también pueden favorecer la adhesión, mientras que estos factores no excedan niveles críticos. Propiedades de la superficie bacteriana como la presencia de fimbrias y flagelos, así como la de polisacáridos y proteínas de superficie, también son importantes y podrían representar una ventaja competitiva para un organismo en una comunidad compuesta por múltiples especies (Donlan, 2002).

3.2 Formación de microcolonias

Luego de la adhesión inicial de las células bacterianas a una superficie tiene lugar el desarrollo de microcolonias, comunidades bacterianas compuestas por entre 3 y 5 capas de microorganismos (Davey & O'Toole, 2000). Además de una interacción estable con una superficie, se requiere un crecimiento clonal de los microorganismos e interacciones bacteria-bacteria para formar y mantener las microcolonias (Reisner et al., 2003).

En el caso de determinadas especies bacterianas la formación de microcolonias es un proceso más complejo, ya que además de los factores mencionados está involucrada la capacidad de algunas bacterias de moverse sobre una superficie (O'Toole & Kolter, 1998).

El crecimiento clonal es controlado simplemente por la presencia de los nutrientes apropiados. Sin embargo, se requieren determinadas vías de transducción de señales para la producción de estructuras de movilidad, como los flagelos, y la producción de EPS, el compuesto predominante que media las interacciones célula-célula estables (Heilmann et al., 1996; Cramton et al., 1999; Watnik & Kolter, 1999; Yildiz & Schollnik, 1999).

Las fimbrias de tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* tienen varios efectos sobre la formación de biofilms, uno de los cuales es permitir la formación de microcolonias en determinadas condiciones (O'Toole & Kolter, 1998; Heydorn et al., 2002). Estas fimbrias median el movimiento *twitching*, un tipo de movimiento que permite a la bacteria moverse a lo largo de una superficie. Aún no se ha determinado si este tipo de movimiento está regulado; sin embargo, la expresión de las fimbrias sí lo está (Stanley & Lazazzera, 2004).

En *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, la formación de microcolonias está mediada por la expresión de la adhesina PIA (polysaccharide intercellular adhesin) (Stanley & Lazazzera, 2004). Diversos factores ambientales influyen en la expresión de PIA, incluyendo glucosa, anaerobiosis, osmolaridad elevada, temperatura, etanol y disponibilidad de hierro (Gotz, 2002). Este rango de factores ambientales puede ser indicativo de los medios en los que *Staphylococcus* forma biofilms (Stanley & Lazazzera, 2004).

3.3 Maduración

Una vez que se han establecido sobre una superficie, los microorganismos sufren una serie de cambios que les permiten adaptarse a su nuevo tipo de vida.

Estudios con microarrays indican que diversas especies (incluyendo *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *E. coli* y *S. aureus*) sufren expresión diferencial de hasta 10% de sus genomas bajo la forma de biofilms en comparación con la vida planctónica (Schoolnik et al., 2001; Whiteley et al., 2001; Schembri et al., 2003; Beenken et al., 2004). Como es de esperar, estas alteraciones en la transcripción están asociadas con cambios fenotípicos en la adhesión de las células entre sí o a una superficie, metabolismo, movilidad y secreción (Nadell et al., 2008). Sin embargo, los estudios de expresión también demuestran que los transcriptomas de los biofilms de cepas o especies diferentes pueden ser

tan diferentes entre sí como lo son de los de las células planctónicas (Beloin & Ghigo, 2005).

Los biofilms maduros no son monocapas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan & Costerton, 2002), sino que pueden presentar una arquitectura compleja, que comúnmente incluye microcolonias en forma de "hongo", rodeadas de matriz extracelular y separadas entre sí por canales que permiten la circulación de fluido (O'Toole et al., 2000). La estructura de los biofilms maduros cambia constantemente debido a procesos internos y externos (Donlan & Costerton, 2002).

Una vez desarrollado el biofilm maduro sobre una superficie, los organismos que forman las estructuras en forma de hongo se comunican entre sí mediante señales químicas difusibles que regulan una variedad de funciones celulares (Jacobsen et al., 2008).

3.4 Dispersión

Las células que forman el biofilm pueden dispersarse mediante los siguientes mecanismos (Donlan, 2002):

1. Multiplicación de las células que se encuentran en proceso activo de crecimiento y posterior desprendimiento de las células hijas.
2. Como consecuencia de bajos niveles de nutrientes en el medio.
3. Como respuesta a señales químicas de *quorum sensing*.
4. A través de la remoción continua de pequeñas porciones del biofilm debido al flujo.

Aparentemente, el modo de dispersión afecta las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados grandes que se desprenden del biofilm tienden a retener algunas características como la resistencia a antimicrobianos, mientras que las células que se desprenden como resultado de la multiplicación celular adoptan rápidamente el fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

4. *Relación entre la formación de biofilms y las enfermedades infecciosas*

Queda claro a partir de evidencia epidemiológica que los biofilms tienen un rol en las enfermedades infecciosas. El proceso puede ser particularmente relevante en el caso de pacientes inmunocomprometidos, que son incapaces de combatir microorganismos invasores. Sin embargo, más allá de la evidencia, los procesos exactos por los que los organismos asociados a biofilms provocan enfermedad en el hospedero humano se comprenden muy poco. Los mecanismos sugeridos incluyen:

1. Desprendimiento de células o agregados celulares a partir de biofilms: De los biofilms pueden desprenderse bacterias individuales o agregados enteros como resultado del crecimiento y división bacterianos dentro de los mismos (Characklis, 1990). Aunque el desprendimiento no ha sido bien caracterizado para biofilms de implantes médicos, algunos aspectos del proceso pueden considerarse universales para todos los biofilms (Characklis, 1990). Estudios han mostrado que un aumento en *shear stress*, como el que ocurre cuando hay cambio en la dirección o ritmo de flujo, resultaría en un aumento de la erosión celular del biofilm (Characklis et al., 1990). También se ha mostrado que el desprendimiento de células o agregados puede estar relacionado con cambios en la concentración de nutrientes (Characklis, 1990). Un ejemplo típico de implante médico que produce infección es el catéter urinario. Estos dispositivos constituyen los implantes médicos más comúnmente utilizados (Darouiche, 2001). Incluso encontrándose bajo un riguroso cuidado, todos los pacientes cateterizados durante un período mayor a un mes desarrollarán infecciones del tracto urinario (ITU) (Kunin, 1987). El número de pacientes cateterizados es tan elevado que las ITU asociadas a catéteres (ITU-c) se incluyen entre las infecciones más comunes que se adquieren en hospitales y otros centros de salud (Warren et al., 1989).

2. Producción de endotoxinas: además de los efectos directos del desprendimiento celular o resistencia a antimicrobianos, las bacterias gram negativas que forman parte de los biofilms de implantes médicos producen endotoxinas, que a su vez inducen una respuesta inmune en el paciente.

3. Provisión de un nicho para la generación de microorganismos resistentes a antibióticos: Se ha demostrado que las bacterias pueden intercambiar plásmidos mediante conjugación dentro de los biofilms, y los plásmidos pueden incluir factores de resistencia a antibióticos (Roberts et al., 1999; Hausner & Wuertz, 1999). Se esperaría que la proximidad física entre bacterias de una misma microcolonia en un biofilm favorezca la conjugación, en comparación con el mismo proceso en bacterias planctónicas (Ehlers & Bouwer, 1999). Además, como se mencionó previamente, el EPS que compone la matriz del biofilm impide físicamente el acceso de determinados antibióticos al mismo, lo que confiere una resistencia intrínseca a las bacterias que lo forman (Donlan & Costerton, 2002). Esto podría ser especialmente relevante en el caso de biofilms de implantes médicos, donde los microorganismos resistentes podrían ser diseminados de paciente en paciente (Donlan & Costerton, 2002).

5. Infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITU-c)

Los catéteres urinarios son dispositivos médicos tubulares de látex o silicona, que se insertan a través de la uretra hasta la vejiga. Estos dispositivos son de uso común en hospitales y casas de salud, y se emplean para tratar la retención y la incontinencia urinarias, medir la salida de orina o recolectar la misma durante una cirugía (Jacobsen et al., 2008; Warren, 1997). Aunque estos dispositivos originalmente fueron diseñados para utilizarse durante períodos cortos de tiempo, la cateterización prolongada se ha convertido en un procedimiento común (Jacobsen et al., 2008).

Debido al uso frecuente y muchas veces innecesario de catéteres urinarios durante la hospitalización (entre el 21 y 50% de los pacientes) (Jain et al., 1995), muchas personas son puestas en riesgo de sufrir complicaciones asociadas al uso de estos dispositivos, siendo la más notable el desarrollo de ITU asociadas a catéteres (ITU-c) (Tambyah & Maki, 2000). Este tipo de infecciones no sólo son significativas debido a su alta incidencia y costo económico resultante, sino también a las severas consecuencias que pueden provocar (Tambyah & Maki, 2000).

Las ITU-c son el tipo más común de infecciones nosocomiales (80%), superando el millón de casos anuales en USA (71) y representando más del 40% del total de infecciones en hospitales y casas de salud (Warren, 1997; Stamm, 1991; Stamm & Hooton, 1993; Hartstein et al., 1981).

Los sistemas de catéteres pueden ser abiertos o cerrados. En el caso de los sistemas abiertos, el catéter drena la orina en un contenedor abierto, mientras que en los sistemas cerrados el catéter vacía su contenido en una bolsa de plástico cerrada (Kaye & Hessen, 1994). En los sistemas abiertos, los catéteres rápidamente se contaminan y los pacientes normalmente desarrollan ITU en 4 días (Kaye & Hessen, 1994). Los pacientes con sistemas cerrados son mucho menos susceptibles a ITU y la orina del paciente puede permanecer estéril de 10 a 14 días en aproximadamente la mitad de los pacientes (Kaye & Hessen,

1994). Independientemente de si el sistema es abierto o cerrado, Stickler notó que entre el 10 y el 50% de los pacientes bajo cateterización de corto plazo (hasta 7 días) desarrollan infecciones, mientras que prácticamente todos los pacientes bajo cateterización prolongada (más de 28 días) desarrollarán ITU (Stickler, 1996). Mc Lean y col. además notaron que el riesgo de ITU-c aumenta aproximadamente en un 10% por cada día que el paciente permanece con el catéter (McLean et al., 1995).

Debido a su alta incidencia, los costos médicos totales de las ITU nosocomiales son muy elevados. Sólo en los Estados Unidos el gasto que conllevan estas infecciones se estima entre 424 y 451 millones de dólares anuales (Jarvis, 1996).

A pesar de que la mayoría de los casos de bacteriurias asociadas al uso de catéteres son asintomáticos, una vez que se vuelven sintomáticos las secuelas resultantes pueden variar entre moderadas (fiebre, uretritis, cistitis) a severas (pielonefritis aguda, daño renal, formación de cálculos, bacteriemia). Si no son tratadas, estas infecciones pueden llevar a urosepsis y muerte (Warren, 1997; Niel-Weisse & van der Breek, 2005). Las ITU-c suelen ser recurrentes como consecuencia del desarrollo de biofilms cristalinos en los catéteres y resultan en morbilidad a largo plazo (Jacobsen et al., 2008). Estos biofilms no sólo provocan la incrustación y bloqueo de los catéteres, sino que aumentan la resistencia de las bacterias a la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Stickler & Zimanoff, 1994).

5.1 Patogénesis

A pesar de que el tracto urinario humano sano posee defensas innatas contra las infecciones microbianas, existen microorganismos específicos que son capaces de colonizar y sobrevivir en este nicho ambiental. De manera similar a otros patógenos de mucosas, los uropatógenos emplean estrategias específicas para infectar el tracto urinario, como la colonización de catéteres urinarios y/o células uroepiteliales, la evasión de las defensas del hospedero, y el daño a las células del mismo. La inserción de un objeto exógeno en la vejiga como lo es un catéter aumenta la susceptibilidad del paciente a ITU, ya que estos dispositivos introducen microorganismos oportunistas al tracto urinario, favoreciendo la iniciación de infecciones. Las infecciones surgen como resultado de que bacterias comensales se vuelven patógenos oportunistas, debido a que maximizan su capacidad de causar enfermedad tomando ventaja de que las defensas del paciente se encuentran disminuidas (Moore et al., 2002). Entre los microorganismos oportunistas más comunes en este tipo de infecciones se encuentran algunas especies de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* y *Pseudomonas*, así como la especie *Staphylococcus epidermidis* (Moore et al., 2002). La mayoría de estos uropatógenos son contaminantes fecales o componentes de la microflora normal o transitoria de la piel del propio paciente que colonizan el área periuretral (Clegg & Gerlach, 1987; Daifuku & Stamm, 1986; Leranoz et al., 1997; Old et al., 1983; Yamamoto et al., 1985). La microflora transitoria que se origina a partir del personal sanitario o por contacto con otros pacientes puede incluir cepas nosocomiales resistentes a antibióticos, lo que dificulta el tratamiento de estas infecciones. La entrada de bacterias a la vejiga puede darse al insertar el catéter, a través de la luz del mismo o en la interfase catéter-uretra (Warren, 1996). El más común de estos mecanismos en las ITU-c es el extraluminal (66% de los casos), donde los microorganismos ascienden desde el meato uretral a lo largo de la interfase catéter-uretra. Los organismos también pueden entrar intraluminalmente (34%), en el cual las bacterias migran hacia la vejiga como resultado de la manipulación del catéter (Tambyah et al., 1999; Warren, 2001).

Los catéteres urinarios pueden dañar la mucosa uroepitelial protectora durante su inserción, lo que expone nuevos sitios de unión para las adhesinas bacterianas (Garibaldi et al., 1980). Finalmente, la presencia de un catéter en el tracto urinario interrumpe las defensas mecánicas naturales del hospedero, lo que provoca una distensión excesiva de la vejiga, impidiendo que ésta se vacíe completamente y acumulando orina residual que constituye un medio de crecimiento para microorganismos (Hashmi et al., 2003).

Los microorganismos causantes de las ITU-c no necesitan tantos factores de virulencia para colonizar y establecer una infección como los patógenos que infectan un tracto urinario completamente funcional, ya que la inserción del catéter facilita estos procesos.

Las adhesinas bacterianas inician la unión al epitelio al reconocer receptores celulares de superficie. La adhesión se produce al vencerse la repulsión electrostática que existe entre la membrana de la célula bacteriana y las superficies de unión, lo que permite que se establezcan interacciones más cercanas entre las mismas (Corpe, 1980). Las adhesinas se expresan diferencialmente a lo largo del proceso de infección, lo que permite no sólo el reconocimiento de distintos tipos de superficies y tipos celulares por parte del patógeno, sino también la evasión del sistema inmune del hospedero. Estas estructuras son capaces de reconocer componentes específicos de la superficie de las células del hospedero y de la matriz extracelular, como proteínas, glicoproteínas, glicolípidos y carbohidratos.

Una vez que se encuentran firmemente adheridas al uroepitelio o a la superficie del catéter, las bacterias sufren un cambio fenotípico, produciendo EPS que las rodean y protegen. Los microorganismos adheridos se replican y forman microcolonias que eventualmente maduran a biofilms (Figura 1). Durante el desarrollo de estas estructuras y luego de que la población bacteriana alcanza determinado umbral de concentración, la formación y desprendimiento de microcolonias son regulados por comunicación intercelular mediante *quorum sensing*, a través de la expresión colectiva de determinados genes. El desprendimiento de células hijas a partir de bacterias en crecimiento, así como

de agregados a partir del biofilm maduro, pueden comenzar nuevos focos de infección en otros lugares del catéter y la vejiga.

Muchos uropatógenos utilizan la movilidad mediada por flagelos para facilitar la diseminación de la infección desde el sitio inicial de colonización hacia el resto del tracto urinario.

5.2 *Proteus mirabilis*

El género *Proteus* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Penner, 1984), y se caracteriza por su capacidad de diferenciarse a partir de una célula vegetativa *swimmer* a una célula elongada altamente flagelada conocida como *swarmer*. Estos organismos están ampliamente distribuidos en varios ambientes, incluyendo aguas contaminadas, suelo y heces, donde *Proteus* cumple un rol en la descomposición de materia orgánica, así como en el tracto digestivo de los mamíferos. Algunas especies de *Proteus* son agentes causantes de una variedad de infecciones nosocomiales oportunistas, incluyendo las del tracto respiratorio, ojos, oído, nariz, piel, quemaduras, garganta y heridas; también pueden causar gastroenteritis (Penner, 1992; Rozalski et al., 1997). Las bacterias del género *Proteus* están más comúnmente asociadas a ITU en individuos con anormalidades estructurales o funcionales, y en especial se relacionan a infecciones ascendentes en pacientes sometidos a cateterización (Warren et al., 1982; Warren et al., 1987). La colonización del tracto intestinal le permite a *Proteus* spp. establecer reservorios para su transmisión al tracto urinario, mediante la colonización intermitente de la región periuretral. Esta colonización intermitente puede derivar en contaminación del catéter, lo que provoca el desarrollo de infecciones (Chow et al., 1979).

Las ITU asociadas a *Proteus* spp. pueden ser difíciles de tratar y la bacteria tiende a persistir debido a complicaciones asociadas a este tipo de infecciones, incluyendo formación de cálculos en la vejiga y los riñones (urolitiasis) que puede llevar a la obstrucción tanto de los catéteres como del tracto urinario (Warren et al., 1987; Chow et al., 1979; Scott, 1960). Las especies del género

Proteus asociadas a ITU son *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*; *P. mirabilis* es la tercer causa más común de ITU complicadas (12%), y la segunda causa más común de bacteriuria asociada a catéteres en cateterizaciones a largo plazo (15%) (Warren, 2001). *P. mirabilis* debe adaptarse al tracto urinario que se encuentra bajo cateterización y producir un arsenal de factores de virulencia finamente regulados, algunos de los cuales se detallan a continuación.

5.3 Adhesinas

Se ha demostrado que las cepas de *P. mirabilis* son capaces de adherirse a distintos polímeros utilizados en la fabricación de catéteres (Hawthorn & Reid, 1990).

Para facilitar la unión a estas superficies, las bacterias deben ser capaces de producir una variedad de factores de adhesión, como fimbrias y hemaglutininas, que se cree juegan un papel importante en la iniciación de las ITU-c (Hoyle et al., 1992).

P. mirabilis produce varias clases de fimbrias, algunas de las cuales están involucradas en la colonización del tracto urinario y posiblemente de la superficie de catéteres. Entre estas se incluyen las fimbrias MR/P (del inglés *mannose-resistant Proteus-like*) (Old & Adegbola, 1982), UCA (*uroepithelial cell adhesin*) (Wray et al., 1986), PMF (*P. mirabilis fimbriae*) (Bahrani et al., 1993) y ATF (*ambient temperature fimbriae*) (Massad et al., 1996).

Las fimbrias mejor estudiadas son las fimbrias MR/P; este tipo de fimbrias son sintetizadas *in vivo*, son inmunogénicas y han sido vinculadas tanto a la autoagregación como a la formación de biofilms. Asimismo, contribuyen a la virulencia de *P. mirabilis*, aunque no son imprescindibles para la misma (Nielubowicz & Mobley, 2010).

Algunos experimentos llevados a cabo por Jansen et al. (Jansen et al., 2004) sugieren que este tipo de fimbrias definen la localización de las bacterias en la vejiga y contribuyen a la formación de biofilms, proceso esencial para el establecimiento de ITU-c.

Las fimbrias UCA facilitan la unión a células uroepiteliales. Las fimbrias ATF no estarían involucradas en la colonización del tracto urinario, mientras que el rol de las fimbrias PMF en la adhesión a las células del hospedero aún no está claro (Belas & Suvanasuthi, 2005).

5.4 Movilidad mediada por flagelos

Generalmente, se considera que los flagelos localizados en la superficie de los patógenos bacterianos colaboran en la adhesión inicial, colonización y diseminación en el hospedero, e interacción con el ambiente extracelular (Belas & Suvanasuthi, 2005). En el caso de *P. mirabilis*, estas estructuras de superficie son importantes para el proceso conocido con el nombre de *swarming*. Teniendo en cuenta que la habilidad de *P. mirabilis* de diseminarse desde el sitio inicial de colonización en la superficie del catéter hasta las células uroepiteliales del tracto urinario es crítica para poder establecer ITU-c, la movilidad flagelar y potencialmente el *swarming* podrían tener un papel importante en este tipo de infecciones.

El *swarming* es un proceso de diferenciación multicelular inducido que les permite a los microorganismos moverse de manera coordinada y expandirse sobre una superficie sólida (Moblely & Belas, 1995; Rather, 2005; Williams & Schwarzhoff, 1978). Durante el crecimiento en un medio líquido, las especies de *Proteus* toman la forma de un bacilo móvil de entre 1 y 2 μm de largo que muestra un fenotipo distintivo, el cual incluye la presencia de flagelos peritricos. Sin embargo, cuando son transferidas a un medio sólido, estas células *swimmer* se diferencian en formas *swarmer* hiperflageladas, multinucleadas, elongadas y no septadas que miden entre 20 y 80 μm de largo. Estas células *swarmer* diferenciadas migran desde el sitio original de inoculación de una manera rápida y altamente coordinada que depende de interacciones multicelulares y señalización célula-célula (Belas, 1992).



Figura 2: Cultivo en placa de *P. mirabilis* en el que se aprecia el fenómeno de *swarming* (fotografía tomada en el Departamento de Microbiología del IIBCE)

5.5 Formación de biofilms

Luego de la colonización inicial de la superficie del catéter durante una ITU-c, *P. mirabilis* forma característicos biofilms cristalinos. Estas estructuras favorecen la supervivencia de *P. mirabilis* en el tracto urinario, contribuyendo en forma evidente a la adhesión de los microorganismos a superficies y protegiéndolos de la acción de antibióticos y la respuesta inmune del hospedero (Hoyle et al., 1992). La formación de cristales durante las ITU producidas por *Proteus* es característica de este tipo de infecciones y es crítica para el desarrollo de biofilms cristalinos. Este tipo de biofilms causan incrustaciones capaces de bloquear los catéteres, lo que los vuelve especialmente problemáticos.

Un elemento esencial en la formación de cristales y por lo tanto en el desarrollo de biofilms cristalinos, es la enzima ureasa producida por *P. mirabilis* (Musher et al., 1975). La urea se encuentra presente en la orina humana en concentraciones que llegan hasta 500 mM (Breitenbach & Hausinger, 1988;

Jones & Mobley, 1987), por lo que no es de sorprender que las ureasas bacterianas jueguen un rol importantísimo en las ITU causadas por *Proteus* (Griffith et al., 1976). La ureasa de *P. mirabilis* se induce en presencia de urea, por lo que se asume que se expresa durante el crecimiento en orina (Jacobsen et al., 2008). La ureasa contribuye al desarrollo de cristales, debido a que cataliza la hidrólisis de urea en dióxido de carbono y amoníaco, el cual alcaliniza el medio local. Este aumento en el pH de la orina provoca la precipitación de fosfato de calcio y fosfato de magnesio-amonio, formando cristales de carbonato de apatita y carbonato de estruvita respectivamente (Griffith et al., 1976). Estos cristales forman agregados macroscópicos junto con las células bacterianas, que se acumulan en la superficie del epitelio urinario y del catéter, formando biofilms y obstruyendo eventualmente el flujo de orina (Stickler et al., 2006). Esto puede producir retención de orina en la vejiga o incontinencia provocada por la pérdida de orina alrededor de los bordes del catéter, lo cual puede comprometer seriamente la salud del paciente (Stickler & Morgan, 2006). Una consecuencia secundaria es la acumulación de niveles tóxicos de amoníaco a partir de la hidrólisis de la urea, lo cual puede dañar los tejidos incluyendo el epitelio renal (Musher et al., 1975).

Estos biofilms cristalinos deben ser eliminados del hospedero para poder resolver la infección completamente, ya que los agentes antimicrobianos pueden resultar inefectivos para eliminar las poblaciones bacterianas asociadas al biofilm (Burke et al., 1981).

7. Microscopía láser confocal como herramienta para el estudio de biofilms

El conocimiento de los biofilms ha ido desarrollándose paralelamente con las metodologías utilizadas para su estudio y caracterización (Donlan & Costerton, 2002). Los primeros trabajos se basaban en la microscopía electrónica de barrido, la cual utiliza solventes orgánicos para deshidratar gradualmente la muestra antes de examinarla. Este proceso de deshidratación provoca una distorsión significativa de los biofilms, lo que proporciona una visión engañosamente simple de su estructura (Donlan & Costerton, 2002; Trautner & Darouiche, 2004).

El desarrollo de la microscopía láser confocal (MLC) en la década de los 80 cambió radicalmente la percepción que se tenía sobre la estructura y función de los biofilms (Davey & O'Toole, 2000). A pesar de que no cuenta con el gran poder de resolución de la microscopía electrónica, esta técnica no requiere de una preparación previa de la muestra, por lo que ofrece la enorme ventaja de poder visualizar biofilms completamente hidratados (Costerton et al., 1995; Lawrence et al., 1991; de Beer & Stoodley, 1995). Esto ha permitido una mejor comprensión de la elaborada estructura tridimensional de los biofilms, así como la observación de su desarrollo en el tiempo.

El uso de MLC implica marcar a los microorganismos con fluoróforos, los cuales emiten luz a determinadas longitudes de onda y pueden ser utilizados para examinar funciones celulares específicas (Donlan & Costerton, 2002).

Moviendo el objetivo en el eje z a intervalos regulares, se obtienen secciones ópticas consecutivas denominadas *stacks*. De esta manera, la MLC permite obtener un gran número de imágenes de planos diferentes de la muestra, lo que elimina efectos fuera de foco que sí están presentes cuando se utilizan otros tipos de microscopía (Donlan & Costerton, 2002; de Beer et al., 1994). Como resultado se obtiene un conjunto de datos tridimensionales que provee información sobre la estructura espacial del objeto. La calidad y precisión de esta información depende del grosor de la muestra y del espacio entre *stacks*

consecutivos. Utilizando herramientas informáticas se pueden generar varios aspectos del objeto a partir del set de datos 3D (reconstrucción 3D, secciones ópticas en cualquier orientación, etc.) (de Beer et al., 1994).

Para poder extraer parámetros morfológicos y evaluar la formación de los biofilms de manera cuantitativa es necesario procesar las imágenes, para lo cual se emplean algoritmos y descriptores matemáticos (de Beer & Stoodley, 1995). Este proceso incluye la distinción entre “voxeles” (píxeles de 3D) que contienen fondo de aquellos que contienen información biológica relevante (de Beer & Stoodley, 1995).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Se propone que al igual que otras especies bacterianas, *P. mirabilis* es capaz de formar biofilms siguiendo patrones específicos y que estructuras como fimbrias y flagelos de este microorganismo jugarían un rol en la formación y desarrollo de los biofilms.

Objetivo general

Caracterizar la formación, arquitectura y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis* y evaluar el papel de flagelos y fimbrias, factores potencialmente asociados con su urovirulencia.

Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento de una cepa uropatogénica de *P. mirabilis*, así como de cinco mutantes isógenicas, en orina artificial.
2. Determinar la capacidad de adhesión de *P. mirabilis* a distintas superficies abióticas.
3. Evaluar las propiedades de hidrofobicidad de la superficie bacteriana implicadas en la formación de biofilms.
4. Caracterizar y comparar la formación, arquitectura y desarrollo de los biofilms de *P. mirabilis* en orina artificial mediante microscopía láser confocal (MLC) de las cepas mencionadas en el punto 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Se empleó una cepa uropatogénica de origen clínico aislada de un paciente con infección del tracto urinario (ITU) sintomática, la cual ha sido caracterizada fenotípica y genotípicamente en el Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) (Zunino et al., 2000). Con el fin de evaluar el papel de flagelos y diversos tipos de fimbrias en el proceso de formación de los biofilms, se utilizaron un conjunto de cepas mutantes isogénicas incapaces de expresar fimbrias ATF, UCA, PMF, MR/P y flagelos. En la Tabla 1 se detallan las cepas empleadas y sus características relevantes.

Como se observa en la Tabla 1, todas las cepas mutantes fueron derivadas de la cepa salvaje Pr2921.

Las cepas fueron cultivadas aeróbicamente a 37° C en caldo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 6.8) y en orina artificial (OA). El medio LB se suplementó con agar 1.5% cuando se requirió medio sólido, y con el antibiótico kanamicina (Km, concentración final 40 µg/mL) cuando fue necesario. El tiempo de incubación varió de acuerdo al ensayo, especificándose el mismo en cada caso.

Las cepas fueron conservadas en LB-glicerol 12% a -80°C con el objetivo de preservarlas a largo plazo.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas. Amp: ampicilina, Tet: tetraciclina, Eri: eritromicina, Pol: polimixina, Km: kanamicina, S: sensible, R: resistente.

Cepas	Descripción	Características relevantes	Fuente/referencia
Pr2921	Aislamiento clínico, paciente con ITU sintomática	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Zunino <i>et al.</i> , 2000
AF	Mutante <i>flaA-B</i> , derivada de Pr2921	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , Km ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Scavone, P. Tesis de Doctorado en proceso, PEDECIBA Biología
MSD2	Mutante <i>mrpA</i> , derivada de Pr2921	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , Km ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Zunino <i>et al.</i> , 2001
P2	Mutante <i>pmfA</i> , derivada de Pr2921	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , Km ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Zunino <i>et al.</i> , 2003
UM1	Mutante <i>ucaA</i> , derivada de Pr2921	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , Km ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Pellegrino <i>et al.</i> , 2005
A4	Mutante <i>atfA-C</i> , derivada de Pr2921	Amp ^S , Tet ^R , Eri ^R , Pol ^R , Km ^R , <i>swarming</i> ⁺ , hemolisina ⁺ , ureasa ⁺	Zunino <i>et al.</i> , 2000

2. Análisis del crecimiento de *P. mirabilis* en orina artificial

Como paso inicial fue necesario realizar las curvas de crecimiento de *P. mirabilis* en OA, ya que no se disponía de datos referentes al crecimiento del microorganismo en este medio. El mismo ensayo fue llevado a cabo paralelamente en LB con el fin de comparar el crecimiento de *P. mirabilis* en ambos medios y determinar el tiempo de incubación necesario para cada uno de los ensayos a realizar.

La OA se preparó de acuerdo al protocolo descrito por Soriano y colaboradores (Soriano et al., 2009), utilizando 0,49 g/L de cloruro de calcio, 0,65 g/L de cloruro de magnesio, 4,6 g/L de cloruro de sodio, 2,3 g/L de sulfato de sodio, 0,65 g/L de citrato de sodio, 0,02 g/L de oxalato de sodio, 2,8 g/L de fosfato de potasio, 1,6 g/L de cloruro de potasio, 1,0 g/L de cloruro de amonio, 25 g/L de urea y 1,0 g/L de caldo tripticasa de soja. La OA se llevó a un pH final de 6,2.

Se prepararon suspensiones en PBS de $DO_{540} = 0.1$ a partir de cultivos frescos en agar LB (LA), y se emplearon 10 μ L de las mismas para inocular placas de microtitulación de 96 pocillos conteniendo 200 μ L de LB u orina artificial. Las placas se pusieron a incubar a 37°C con agitación, realizándose medidas de absorbancia en el tiempo inicial y sucesivamente cada dos horas a 540 nm en el caso de los cultivos en orina artificial, y a 600 nm para los cultivos en LB, hasta alcanzar las 30 horas de incubación.

Para los cultivos en orina artificial, se realizaron medidas de pH del medio junto con las medidas de absorbancia.

3. Evaluación del papel de flagelos y fimbrias en la formación y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno

3.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

La hidrofobicidad celular es una propiedad física de la superficie bacteriana que potencia la afinidad de la misma por sustratos no polares como las superficies plásticas, lo que está implicado en la adhesión y por lo tanto, en la capacidad de formación de biofilms. Para evaluar la influencia de los flagelos y distintos tipos de fimbrias en esta propiedad, se empleó el método de partición por xileno (Bibiloni et al., 2001).

A partir de cultivos frescos de las cepas en LA, se prepararon suspensiones en PBS de $DO_{540} = 0.2-0.3$. Se emplearon 10 μ L de las suspensiones para inocular tubos de vidrio conteniendo 5 mL de LB u orina artificial y los mismos fueron incubados 48 horas a 37°C sin agitación. Partiendo de estos cultivos, se prepararon suspensiones en PBS de similar DO_{540} , las cuales se mezclaron con xileno y se dejaron reposar durante 20 minutos para permitir que se separaran por decantación la fase orgánica y la acuosa. A continuación, se removió esta última y se midió la DO_{540} de la misma. La disminución de la turbidez de esta fase se consideró como una medida de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, que se calculó según la fórmula

$$H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

donde H% corresponde al índice de hidrofobicidad, y A_0 y A corresponden a la DO_{540} medida antes y después del tratamiento con xileno respectivamente.

3.2 Determinación de la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas

Para determinar la capacidad de adhesión a superficies abióticas se empleó una técnica semicuantitativa que permite estimar indirectamente el biofilm adherido a las mismas mediante tinción con cristal violeta (CV) (O'Toole & Kolter, 1998). En el presente trabajo se emplearon placas de microtitulación de poliestireno y tubos de vidrio, para evaluar si existen diferencias de adhesión entre una superficie y otra.

Para el ensayo en tubo, se prepararon suspensiones bacterianas en PBS de $DO_{540} = 0.2-0.3$ a partir de cultivos frescos en LA y se emplearon 10 μL de las mismas para inocular tubos de vidrio conteniendo 5 mL de LB u orina artificial. Estos cultivos iniciales, o precultivos, se prepararon con el doble objetivo de estandarizar la concentración de partida y de lograr que las bacterias se encontraran en etapa exponencial de crecimiento al momento de inocular los cultivos finales. Asimismo, cumplen el propósito de aumentar la concentración bacteriana.

Los precultivos fueron incubados 48 horas a 37°C sin agitación y se emplearon 30 μL de los mismos para inocular 3 mL de medio en tubos de vidrio. Dichos tubos se incubaron a su vez 24 horas sin agitación junto con tubos que contenían sólo medio para ser usados como blancos. Luego, se removió el medio, se lavó dos veces con agua destilada para eliminar las células planctónicas y las células adheridas se tiñeron con CV 1% durante 20 minutos. A continuación, se solubilizó el CV con 3 mL de etanol 95% y se determinó la DO_{540} .

Para el ensayo en placa, se siguió el mismo procedimiento, empleándose 20 μL de los precultivos iniciales para inocular 200 μL de medio por pocillo. Como blancos de absorbancia se utilizaron pocillos que sólo contenían medio.

4. Caracterización de la formación y arquitectura de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno

Se realizó una caracterización morfo-topológica de los biofilms de la cepa salvaje así como de las mutantes mediante MLC. Para ello, se prepararon cultivos de todas las cepas en caldo LB y en orina artificial en tubos de plástico conteniendo cubreobjetos de vidrio estériles, los cuales fueron utilizados como soporte para la formación de biofilms. Se obtuvieron biofilms correspondientes a 1 hasta 7 días de incubación. Con el fin de observarlos mediante MLC, se realizó inmunofluorescencia *in situ* de los mismos (Nadell et al., 2008; Brady et al., 2007; Chalmers et al., 2008) empleando un anticuerpo primario anti-*P. mirabilis* policlonal previamente obtenido en el Departamento de Microbiología del IIBCE (Schlapp et al., 2011) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FIT-C). Los biofilms fueron tratados además con el fluoróforo Hoescht 33342 con el objetivo de marcar el ADN bacteriano. A continuación se detallan los procedimientos realizados.

4.1 Formación de biofilms *in vitro*

A partir de cultivos frescos de todas las cepas en LA se prepararon suspensiones en PBS de $DO_{540} = 0.2-0.3$ y se emplearon 300 μ L de las mismas para inocular tubos de plástico conteniendo 30 mL de medio y un cubreobjetos de vidrio estéril cada uno. Los tubos se incubaron a 37°C sin agitación y los cubreobjetos se retiraron diariamente hasta el séptimo día de incubación. Una vez obtenidos de esta manera, los cubreobjetos se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente y los biofilms se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 minutos para ser sometidos a inmunofluorescencia *in situ*.

4.2 Inmunofluorescencia in situ de biofilms

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Schlapp y colaboradores (Schlapp et al., 2011). Los cubreobjetos fijados en paraformaldehído se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un *buffer* permeabilizante (BP: albúmina bovina 2%, NH₄Cl 50 mM y saponina 0,1% o Tritón 100 0,3% en PBS) durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó por una hora con una dilución 1/50 de suero policlonal anti-*P. mirabilis*, preparada en *buffer* no permeabilizante (BNP, albúmina bovina 2% y NH₄Cl 50 mM en PBS). Se procedió a lavar 3 veces con PBS y finalmente los cubreobjetos fueron expuestos a 1 µL de FIT-C anti-IgG de ratón y 7,5 µL de Hoescht 33342, ambos diluidos en 100 µL de *buffer* NP, durante 30 minutos. Se realizó un último lavado y se montó sobre portaobjetos empleando 10 µL de citifluor AF1 (agente antidecolorante en solución de glicerol y PBS) como solución montante y los cubreobjetos se conservaron a 4°C en cámaras húmedas hasta su visualización, con el fin de evitar su deshidratación.

4.3 Análisis de la estructura tridimensional de los biofilms mediante MLC

Los biofilms fueron examinados mediante un microscopio láser confocal directo Olympus BX-61 FV300, empleando el *software* Olympus Fluoview Versión 4.3. Tanto el microscopio como el *software* se encuentran disponibles en el IIBCE. La visualización se llevó a cabo con un objetivo de inmersión en aceite 100x, apertura numérica 1.35 y empleando láseres de excitación/emisión 488/520 nm (KrAr) y 405/460 nm. Se seleccionaron entre 3 y 5 campos al azar en cada cubreobjetos y se obtuvieron *stacks* en el eje z empleando un *step size* de 0.3 µm entre una imagen y la siguiente. Se utilizó un tamaño de imagen de 1024 x 1024 píxeles y un tamaño de pixel de 0.070 µm.

4.4 Procesamiento de imágenes obtenidas mediante MLC

Una imagen es una representación visual de un objeto o grupo de objetos. El procesamiento de imágenes consiste en obtener la información que éstas contienen con el fin de cuantificarla (Image-Pro[®] Plus).

4.4.1 Deconvolución de imágenes

La deconvolución es una técnica de procesamiento de datos que revierte la distorsión óptica generada por un microscopio al adquirir una imagen, mejorando su contraste y resolución. En esencia, las técnicas de deconvolución utilizan información que describe cómo el microscopio produce una imagen borrosa (fenómeno conocido como *blurring*), como base para una transformación matemática que reenfoca o agudiza la imagen (Schlapp, 2009).

Las imágenes se deconvolucionaron utilizando el *software* Huygens Scripting (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands –<http://www.svi.nl/www.svi.nl>).

4.4.2 Segmentación de imágenes

La segmentación es un método muy importante de procesamiento de imágenes que permite distinguir objetos que contienen información biológica relevante de aquellos que no; éstos últimos constituyen el fondo o *background* de la imagen (Parton & Davis, 2004).

Las imágenes deconvolucionadas se segmentaron en forma manual empleando la plataforma IDL 7.0 (Interactive Data Language, ITT, Co, USA), con el cual se desarrolló el software Sciansoft (www.scian.cl).

La segmentación se llevó a cabo utilizando técnicas de *thresholding* (umbral) y filtrado. El *thresholding* permite reducir la imagen a sólo dos colores: blanco y negro. Esto se logra especificando el rango de intensidades que se quiere enfatizar (las cuales se designan en blanco) y convirtiendo todas las demás a negro (Parton & Davis, 2004).

Los filtros reducen o aumentan las transiciones de intensidad que hay dentro de una imagen: las áreas de una imagen en las que hay cambios repentinos de

intensidad aparecen como bordes marcados, mientras que aquellas en las que hay cambios graduales se ven como bordes más suaves. La técnica de filtrado actúa detectando y modificando el cambio en estos bordes; puede aumentar las diferencias de intensidad en un borde suave para hacerlo aparecer más marcado, o reducir las diferencias de intensidad en bordes fuertes para suavizarlos. Los filtros modifican el valor de cada pixel basándose en los pixeles que lo rodean.

En el presente trabajo se emplearon diferentes filtros, incluyendo *median*, que suaviza imágenes preservando los contornos, *open close*, que cierra contornos abiertos, y *fill remove*, que rellena huecos y remueve objetos pequeños (Schlapp, 2009; Parton & Davis, 2004).

4.4.3 Cálculo de parámetros y reconstrucción de modelos 3D de biofilms

A partir de las imágenes segmentadas y de los modelos 3D se calculó el número de bacterias, el volumen total de bacterias y el volumen total cubierto para cada *stack*.

El volumen total de bacterias es la sumatoria de los volúmenes individuales de todas las bacterias de un *stack*, mientras que el volumen total cubierto de cada campo se calculó a partir de la fórmula

$$V_{tc} = \frac{V_{bact} \times 100}{Vol\ tot\ stack}$$

Donde V_{tc} corresponde al volumen total cubierto, V_{bact} al volumen total de bacterias y $Vol\ tot\ stack$ al volumen total del *stack*.

Para calcular este último primeramente fue necesario obtener el área real de imagen, el cual resulta de multiplicar el tamaño de pixel (0.070 μm) por la cantidad total de pixeles (1024) y elevar al cuadrado el resultado (71.68 μm). Este último paso se debe a que el largo y el ancho de la imagen son iguales.

El procedimiento se puede resumir en la siguiente fórmula:

$$\text{Área imagen} = (0.070 \mu\text{m} \times 1024 \text{ pixeles})^2 = 5138 \mu\text{m}^2$$

Una vez conocida el área se procedió a calcular el volumen de cada *stack*, multiplicando la misma por la distancia entre un *slice* y el siguiente (0.3 μm). Finalmente, para obtener el volumen total del *stack* se multiplicó el ancho por el largo del *slice*, por la cantidad total de *slices* en el *stack*, por el *step size* entre un *slice* y el siguiente.

El procedimiento se puede resumir en la fórmula

$$\text{Vol tot stack} = 71.68 \mu\text{m} \times 71.68 \mu\text{m} \times 0.3 \mu\text{m} \times \text{N}^\circ \text{ slices}$$

5. Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos en todos los ensayos para las distintas cepas y medios de crecimiento se empleó el test estadístico de Duncan.

Por otro lado, para determinar las diferencias entre los valores de los parámetros obtenidos por análisis de imágenes se utilizó el test estadístico t de student.

En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. *Análisis del crecimiento de P. mirabilis en orina artificial*

Como primera aproximación al estudio del crecimiento de *P. mirabilis* en OA se realizaron las curvas de crecimiento de todas las cepas en dicho medio (Figuras 3 a 8), así como en LB, con el fin de determinar la existencia de diferencias entre el crecimiento en uno y otro medio.

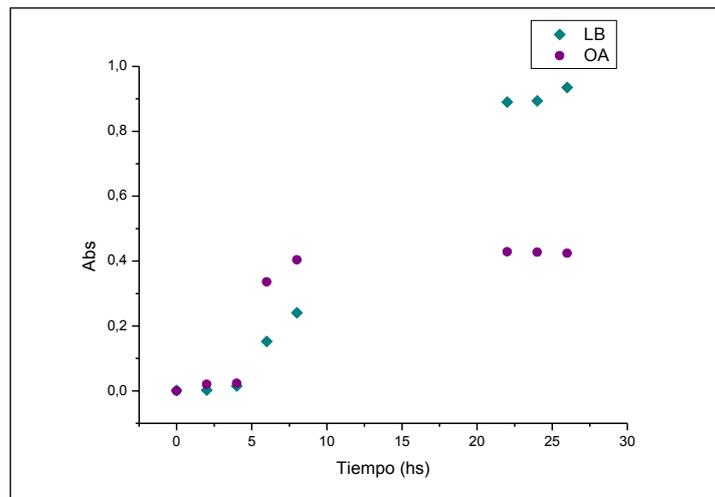


Figura 3: Crecimiento de la cepa salvaje Pr2921 en LB y OA

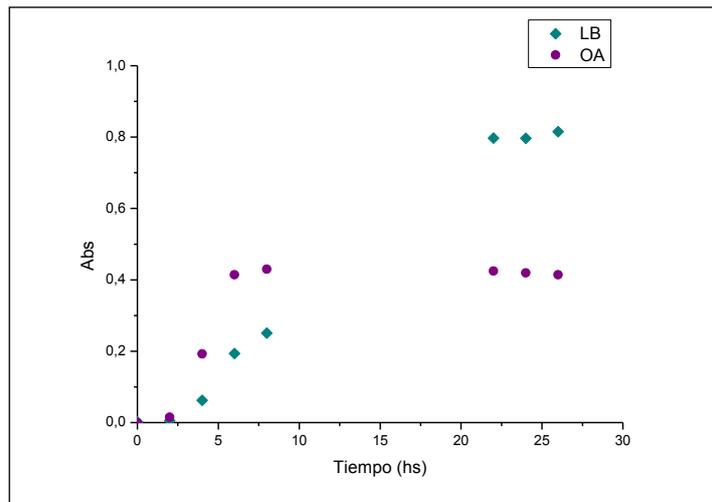


Figura 4: Crecimiento de la cepa mutante flagelar AF en LB y OA.

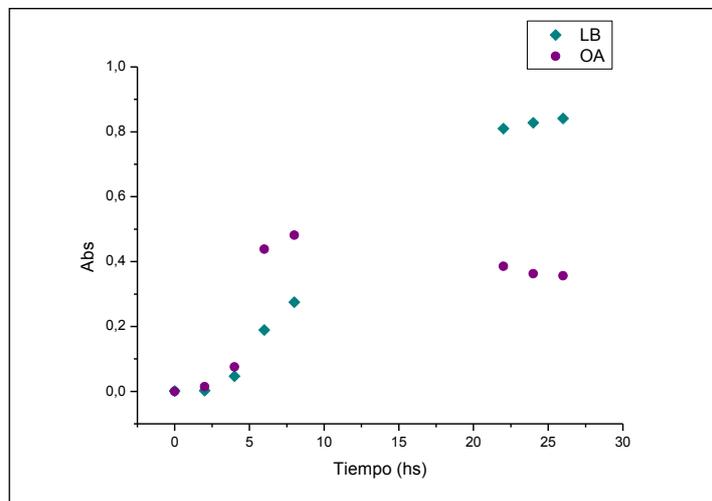


Figura 5: Crecimiento de MSD2 (cepa mutante en fimbrias MR/P) en LB y OA.

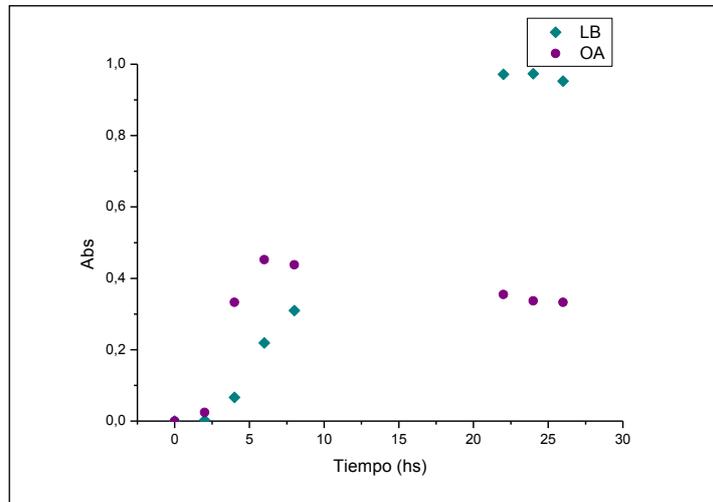


Figura 6: Crecimiento de P2 (cepa mutante en fimbrias PMF) en LB y OA

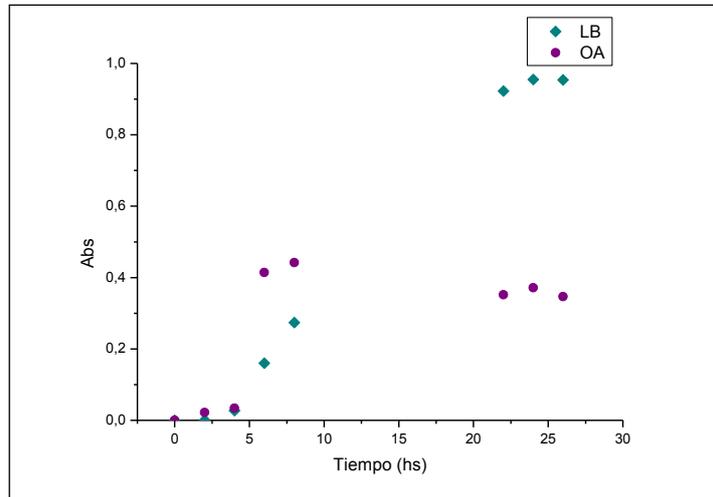


Figura 7: Crecimiento de UM1 (cepa mutante en fimbrias UCA) en LB y OA

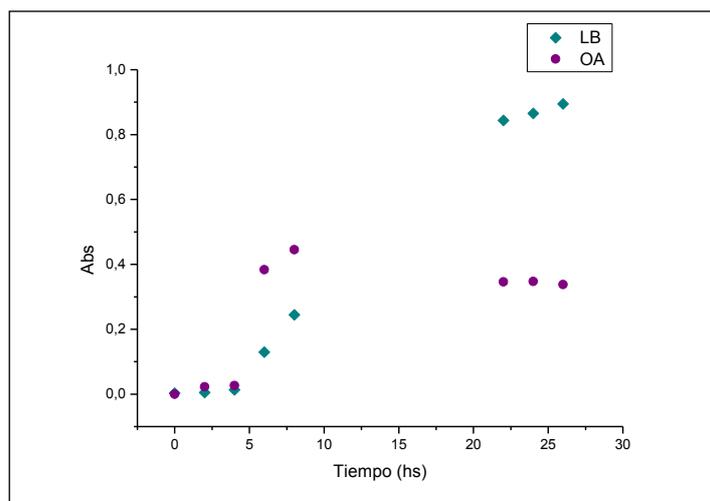


Figura 8: Crecimiento de A4 (cepa mutante en fimbrias ATF) en LB y OA

El crecimiento en LB resultó ser similar para todas las cepas, así como el crecimiento en OA.

Sin embargo, al comparar el crecimiento en los distintos medios se observó que a tiempos finales de incubación la absorbancia de los cultivos de OA es aproximadamente la mitad que la de los cultivos en LB. Esto indicaría que *P. mirabilis* no logra alcanzar recuentos tan altos al ser cultivado en OA como los que alcanza al ser cultivado en LB.

Teniendo en cuenta que *P. mirabilis* es capaz de expresar la enzima ureasa, la cual provoca la acumulación de amonio en el medio y por lo tanto su alcalinización, se determinó el pH de la OA junto con cada medida de absorbancia con el fin de evaluar la existencia de una relación entre el aumento del mismo y los bajos recuentos observados en los tiempos finales de incubación. A partir de los resultados obtenidos se realizaron gráficas de pH en función del tiempo de incubación en OA para todas las cepas. Debido a que los valores fueron iguales en todos los casos, sólo se muestra la gráfica correspondiente a la cepa salvaje Pr2921 (Figura 9).

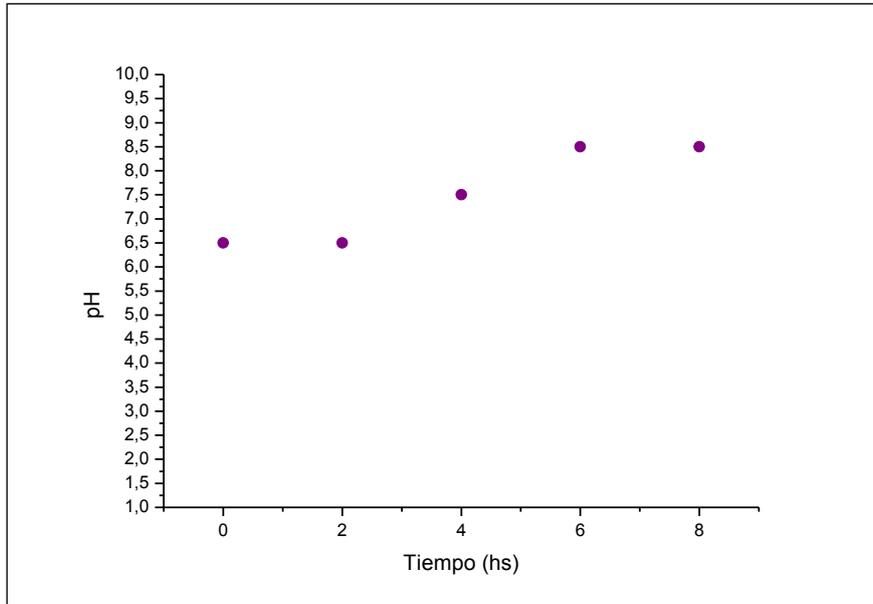


Figura 9: Gráfica de pH del medio en función de tiempo de incubación del cultivo de la cepa salvaje Pr2921 en OA

Los resultados muestran un aumento en el pH de la OA que coincide en el tiempo con la entrada del microorganismo en la etapa exponencial del crecimiento (Figuras 3 a 9).

2. Evaluación del papel de flagelos y fimbrias en la formación y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis* uropatogénico

2.1 Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

A partir de los resultados obtenidos del ensayo de partición por xileno se calcularon los índices de hidrofobicidad de cada cepa en ambos medios; los mismos se muestran en la gráfica a continuación (Figura 10). Con el fin de comparar los valores obtenidos se realizó el test estadístico de Duncan, en donde las diferencias se consideraron significativas para valores de $p \leq 0.05$.

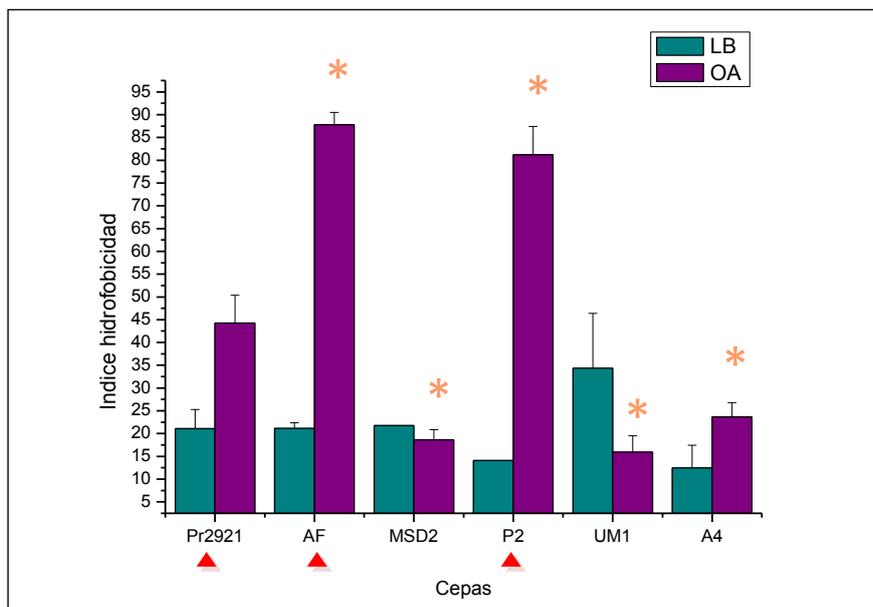


Figura 10: Gráfica del índice de hidrofobicidad de cada cepa en LB y OA. El asterisco anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que las cepas que presentaron diferencias significativas entre LB y OA son señaladas por un triángulo rojo bajo el eje.

Al analizar los resultados del ensayo realizado en LB se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre los valores de los índices de hidrofobicidad de las cepas mutantes con respecto a la salvaje.

Por otro lado, al ser cultivadas en OA los índices de AF y P2 (incapaces de expresar flagelos y fimbrias PMF respectivamente) resultaron significativamente mayores que el de la cepa salvaje Pr2921, mientras que los de las restantes cepas mutantes fueron significativamente menores.

Al comparar los índices de hidrofobicidad de cada cepa entre ambos medios se observó un aumento significativo en el índice de Pr2921, AF y P2 cuando las cepas fueron cultivadas en OA.

2.2 Determinación de la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos de adhesión a poliestireno (Figura 11) y a vidrio (Figura 12).

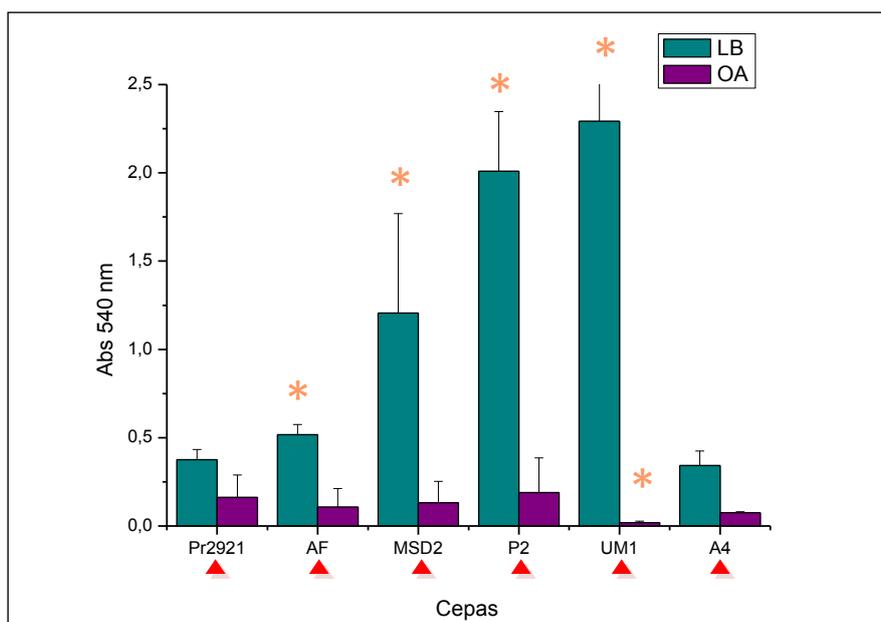


Figura 11: Gráfica de adhesión a poliestireno a las 24 hs de incubación en LB y OA para todas las cepas. El asterisco anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que las cepas que presentaron diferencias significativas entre LB y OA son señaladas por un triángulo rojo bajo el eje.

Con excepción de A4 (mutante en fimbrias ATF), que no presentó diferencias significativas con la cepa salvaje, los valores de adhesión a poliestireno en LB de todas las cepas mutantes fueron significativamente mayores que los de la cepa salvaje Pr2921.

En cuanto a la adhesión a poliestireno en OA, el valor de la mutante en fimbrias UCA (UM1) resultó significativamente menor que el de la cepa salvaje; el resto de las cepas mutantes no presentaron diferencias significativas con respecto a Pr2921.

En todos los casos la adhesión a poliestireno fue significativamente mayor en LB que en OA.

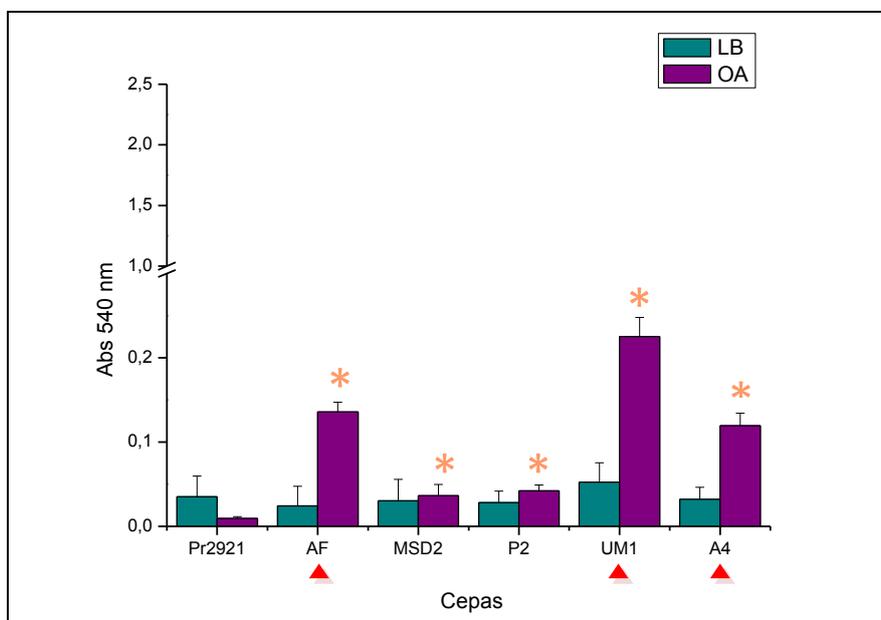


Figura 12: Gráfica de adhesión a vidrio a las 24 hs de incubación en LB y OA para todas las cepas. El asterisco anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que las cepas que presentaron diferencias significativas entre LB y OA son señaladas por un triángulo rojo bajo el eje.

Con respecto a los resultados del ensayo de adhesión a vidrio, en LB ninguna de las cepas mutantes mostró diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje.

En OA, en cambio, los valores de adhesión de todas las cepas mutantes resultaron significativamente mayores que el de Pr2921.

Los valores de adhesión de AF, UM1 y A4 (mutantes en flagelos, fimbrias UCA y fimbrias ATF respectivamente) resultaron significativamente mayores en OA

con respecto a LB. El resto de las cepas no mostró diferencias significativas entre uno y otro medio.

Comparación en la formación de biofilms sobre vidrio y poliestireno

Al comparar los valores de adhesión a las distintas superficies, se observó que en LB la adhesión a poliestireno fue significativamente mayor que la adhesión a vidrio para todas las cepas.

En OA los valores de adhesión a poliestireno de la cepa salvaje Pr2921 y las mutantes en fimbrias UCA y ATF (UM1 y A4 respectivamente) resultaron significativamente mayores que los de adhesión a vidrio, mientras que el resto de las cepas no presentaron diferencias significativas entre ambas superficies al ser incubadas en este medio.

3. Caracterización de la formación y arquitectura de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno

Una vez que las imágenes obtenidas mediante MLC fueron deconvolucionadas y segmentadas, se procedió a calcular los parámetros de volumen y a la reconstrucción de modelos 3D mediante el *software* ScianSoft. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

3.1 Cálculo de parámetros

Para cada cepa, cada medio y cada día de incubación se calcularon 3 parámetros diferentes: número de bacterias, volumen ocupado y volumen total cubierto.

3.1.1 Número de bacterias

Una vez determinado el número de bacterias presentes en cada campo, se calcularon el promedio y la desviación estándar y a partir de los valores obtenidos para cada cepa se graficó el número de bacterias en función del tiempo de incubación (Anexo I).

Los resultados obtenidos con respecto al número de bacterias se resumen en las tablas a continuación (Tablas 2-4).

Relación entre el número de bacterias de las distintas cepas en LB
y OA

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Pr2921							
AF							
MSD2							
P2							
UM1							
A4							

Tabla 2: Diferencias significativas en número de bacterias entre LB y OA. Los días en los que el parámetro es significativamente mayor en LB que en OA se marcan en azul oscuro, mientras que aquellos en los que es significativamente menor se marcan en celeste. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

La tabla 2 permite observar que, con excepción de Pr2921 en el cuarto día de incubación, en todos los casos en los que el número de bacterias presentó diferencias significativas entre los medios el parámetro resultó significativamente mayor en LB que en OA.

Además, se observa que mientras que la mutante flagelar AF presenta diferencias significativas entre ambos medios a lo largo de todo el tiempo de incubación, en el caso de la mutante fimbrial MSD2 no hay diferencias significativas en ningún día de incubación.

Variación del número de bacterias respecto a la cepa salvaje Pr2921

	LB							OA						
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
AF														
MSD2														
P2														
UM1														
A4														

Tabla 3: Diferencias significativas en número de bacterias de las cepas mutantes con respecto a la salvaje en LB y OA. Los días en los que el número de bacterias de las cepas mutantes resultó significativamente mayor que el de Pr2921 se marcan en violeta oscuro, mientras que los días en los que resultó significativamente menor con respecto a la cepa salvaje se marcan en lila. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

La tabla 3 muestra que cuando los microorganismos fueron incubados en LB se observó una mayor cantidad de diferencias significativas en el número de bacterias entre Pr2921 y las cepas mutantes.

Al comparar las cepas mutantes con respecto a la salvaje se observa que AF, P2, UM1 y A4 presentan un mayor número de bacterias que Pr2921 la mayoría de los días de incubación en LB. Por otro lado, el número de bacterias de MSD2 no superó significativamente en ningún momento al de la cepa salvaje.

A partir de la tabla también fue posible notar que si bien se observaron diferencias significativas con Pr2921 la mayoría de los días de incubación en

LB, en OA las cepas mutantes únicamente presentaron diferencias con la salvaje el tercer o cuarto día de incubación.

Variación en el número de bacterias de las distintas cepas a lo largo del tiempo de incubación

	LB						OA					
	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4
D1-D2		▲	▲									
D2-D3	▲	▼		▼		▲						▲
D3-D4	▼					▼						
D4-D5	▲						▼					
D5-D6		▲				▼						
D6-D7	▼	▼								▼		▲

Tabla 4: Diferencias significativas en número de bacterias entre días de incubación en LB y OA. Los días consecutivos en los que hubo un aumento significativo del número de bacterias se marcan con un triángulo, mientras que los que mostraron una disminución significativa se señalan con un triángulo invertido. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

La tabla 4 permite notar que para todos los casos en LB se produce una mayor cantidad de variaciones en el número de bacterias a lo largo del tiempo que en OA.

3.1.2 Volumen total de bacterias

El volumen total de bacterias de cada campo se calculó sumando el volumen individual de cada bacteria presente en el mismo. Los gráficos de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación representan los valores promedio y desvíos estándar para cada condición (Anexo II).

Los resultados obtenidos con respecto al volumen total de bacterias se resumen en las tablas a continuación (Tablas 5-7).

Relación entre el volumen total de bacterias de las distintas cepas en LB y OA

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Pr2921							
AF							
MSD2							
P2							
UM1							
A4							

Tabla 5: Diferencias significativas en volumen total de bacterias entre LB y OA. Los días en los que el parámetro es significativamente mayor en LB que en OA se marcan en azul oscuro, mientras que aquellos en los que es significativamente menor se marcan en celeste. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Al igual que en el caso del número de bacterias, el volumen total de bacterias resultó significativamente mayor en LB que en OA en todos los casos donde se observaron diferencias significativas entre ambos medios, con excepción de la cepa salvaje. En este caso, sin embargo, la diferencia fue en el sexto día de incubación.

Es destacable que en el segundo día de incubación el volumen total de bacterias fue significativamente mayor en LB que en OA para la mayoría de las cepas.

Variación del volumen total de bacterias respecto a la cepa salvaje Pr2921

	LB							OA						
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
AF		■		■		■							■	
MSD2	■		■		■								■	
P2		■		■								■		
UM1		■		■		■		■						
A4	■	■		■	■		■			■			■	

Tabla 6: Diferencias significativas en volumen total de bacterias de las cepas mutantes con respecto a la salvaje en LB y OA. Los días en los que el volumen de bacterias de las cepas mutantes resultó significativamente mayor que el de Pr2921 se marcan en violeta oscuro, mientras que los días en los que resultó significativamente menor con respecto a la cepa salvaje se marcan en lila. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Con excepción de la cepa MSD2 (incapaz de expresar fimbrias MR/P), el volumen total de bacterias de las cepas mutantes resultó significativamente

mayor que el de la cepa salvaje Pr2921 los días en los que se observaron diferencias significativas. En LB, dichas diferencias se observaron mayormente los días 2 y 4 de incubación, mientras que en OA las mismas se dieron mayormente el sexto día de incubación.

	LB						OA					
	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4
D1-D2		▲	▲	▲	▲							
D2-D3	▲	▼		▼	▼							▲
D3-D4	▼					▼						
D4-D5	▲					▲						
D5-D6		▲				▼	▲	▼				
D6-D7										▼		▲

Tabla 7: Diferencias significativas en volumen total de bacterias entre días de incubación en LB y OA. Los días consecutivos en los que hubo un aumento significativo del número de bacterias se marcan con un triángulo, mientras que los que mostraron una disminución significativa se señalan con un triángulo invertido. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Variación en el volumen total de bacterias de las distintas cepas a lo largo del tiempo de incubación

Se observó que en LB las cepas AF, MSD2, P2 y UM1 (mutantes en flagelos, fimbrias MR/P, PMF y UCA respectivamente) mostraron un aumento en el volumen total de bacterias al segundo día de incubación, mientras que AF, P2 y UM1 presentaron una disminución en el valor del parámetro al día siguiente.

Al igual que sucedió en el caso del número de bacterias, la mayoría de las variaciones en el volumen total de bacterias fueron en LB.

3.1.3 Volumen total cubierto

A partir de los valores obtenidos de volumen total cubierto de cada *stack* se calcularon el promedio y el desvío estándar para cada cepa y cada condición, y los resultados fueron graficados en función de los días de incubación (Anexo III).

Los resultados obtenidos con respecto al volumen total cubierto se resumen en las tablas a continuación (Tablas 8-10).

Relación entre el volumen total cubierto de las distintas cepas en LB y OA

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Pr2921							
AF							
MSD2							
P2							
UM1							
A4							

Tabla 8: Diferencias significativas en volumen total cubierto entre LB y OA. Los días en los que el parámetro es significativamente mayor en LB que en OA se marcan en azul oscuro. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Todos los casos en los que se observaron diferencias significativas en el volumen total cubierto entre ambos medios los valores resultaron significativamente mayores en LB con respecto a OA, similarmente a lo observado para los otros dos parámetros.

En el caso de las cepas mutantes en flagelos, fimbrias PMF y fimbrias UCA (AF, P2 y UM1 respectivamente) se observaron diferencias significativas al segundo día de incubación, mientras que dos de las cepas restantes las presentaron al primer día (cepa salvaje) y al tercero (A4, mutante en fimbrias ATF).

Variación del volumen total cubierto respecto a la cepa salvaje Pr2921

	LB							OA						
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
AF														
MSD2														
P2														
UM1														
A4														

Tabla 9: Diferencias significativas en volumen total cubierto de las cepas mutantes con respecto a la salvaje en LB y OA. Los días en los que el volumen total cubierto de las cepas mutantes resultó significativamente mayor que el de Pr2921 se marcan en violeta oscuro, mientras que los días en los que resultó significativamente menor con respecto a la cepa salvaje se marcan en lila. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Al igual que sucedió en el caso del volumen total de bacterias, se observó una mayor cantidad de diferencias significativas entre Pr2921 y las cepas mutantes cuando las mismas fueron cultivadas en LB.

De la misma manera, los valores de la mayoría de las cepas mutantes fueron significativamente mayores que los de la cepa salvaje los días 2 y 4 de incubación en LB.

Por otro lado, en OA se registraron menos diferencias entre las cepas mutantes y Pr2921. Fue posible notar que en el sexto día de incubación en este medio tanto la mutante flagelar como las mutantes en fimbrias MR/P y ATF presentaron valores significativamente menores a los de la cepa salvaje.

Variación en el volumen total cubierto de las distintas cepas a lo largo del tiempo de incubación

	LB						OA					
	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4	Pr2921	AF	MSD2	P2	UM1	A4
D1-D2		▲	▲		▲							
D2-D3	▲	▼	▼	▼	▼	▲						
D3-D4	▼					▼						
D4-D5	▲											
D5-D6							▲					
D6-D7		▼								▼		▲

Tabla 10: Diferencias significativas en volumen total cubierto entre días de incubación en LB y OA. Los días consecutivos en los que hubo un aumento significativo del número de bacterias se marcan con un triángulo, mientras que los que mostraron una disminución significativa se señalan con un triángulo invertido. Test estadístico t de Student, $p \leq 0.05$

Al igual que para los demás parámetros, en todos los casos se observó una mayor variación en el volumen total cubierto cuando las bacterias se cultivaron en LB con respecto a cuando fueron crecidas en OA.

Al segundo día de incubación en LB el volumen total cubierto de las cepas AF, MSD2 y UM1 (incapaces de expresar flagelos, fimbrias MR/P y fimbrias UCA respectivamente) aumentó significativamente, mientras que al día siguiente estas cepas junto con P2 (mutante en fimbrias PMF) presentaron una disminución en el valor de este parámetro.

Es importante notar que las dos cepas restantes, la salvaje y la mutante en fimbrias ATF, mostraron un aumento al tercer día y una disminución al cuarto.

3.2 Construcción de modelos 3D de biofilms

A continuación se muestran los modelos 3D de los biofilms construidos a partir de las imágenes que se obtuvieron mediante MLC (Figuras 13-16).

Para el cálculo de parámetros sólo se utilizaron datos de biofilms marcados con *Hoestch*, sin embargo, en esta sección se muestran también modelos construidos a partir de biofilms marcados con FIT-C.

Para cada cepa se muestran los modelos correspondientes al segundo y quinto día de incubación, en LB y OA. Los modelos que se aprecian en azul corresponden a aquellos biofilms marcados con el fluoróforo *Hoestch*, mientras que los que aparecen en verde corresponden a los biofilms marcados con el fluoróforo FIT-C.

LB

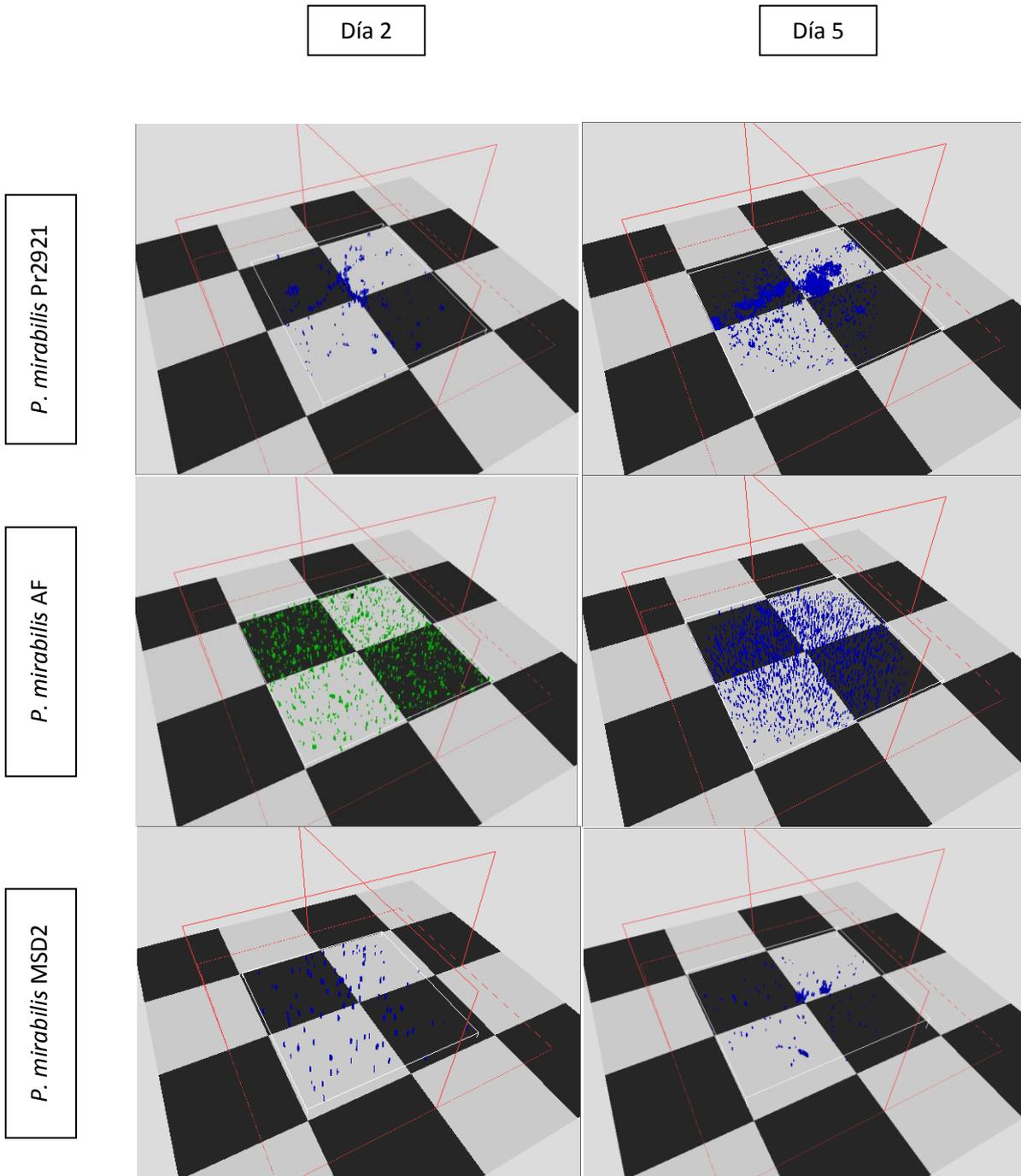


Figura 13: Modelos tridimensionales de los biofilms formados por las cepas Pr2921, AF y MSD2 en los días 2 y 5 de incubación en LB.

LB

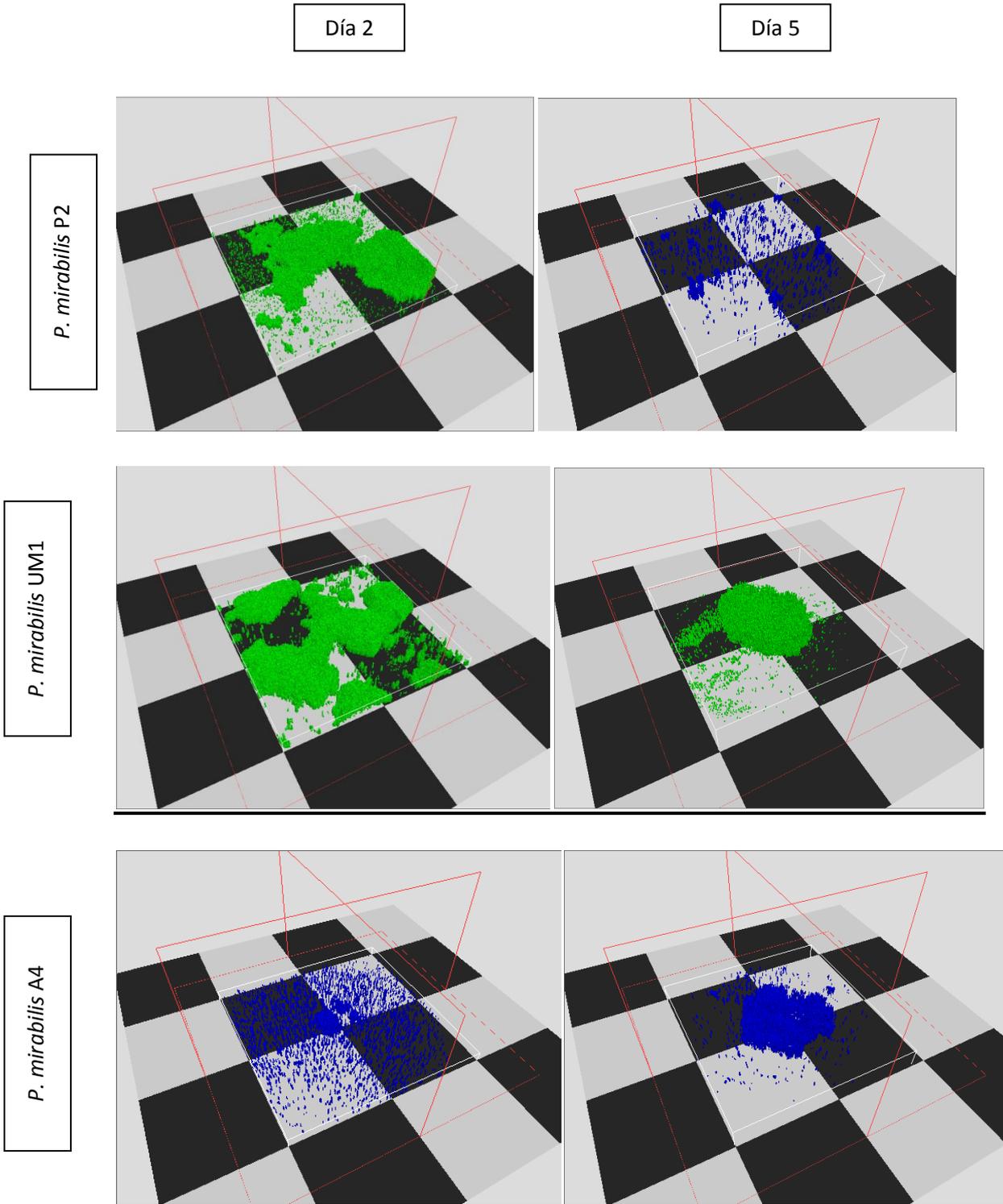


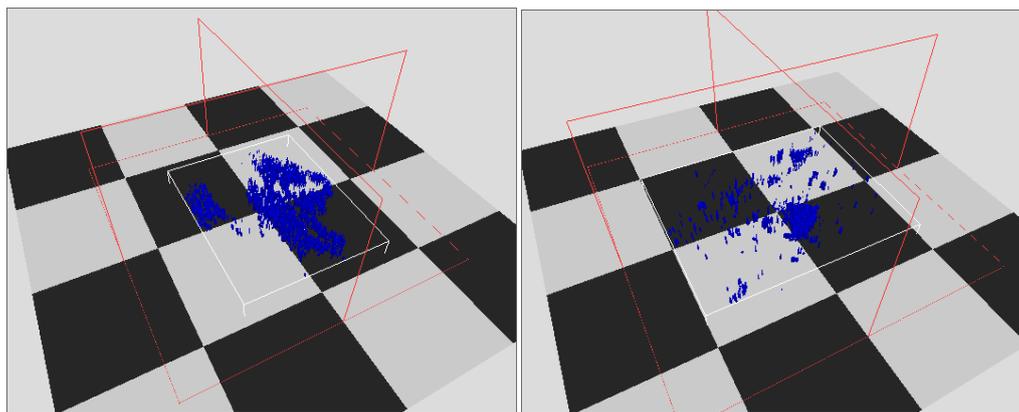
Figura 14: Modelos tridimensionales de los biofilms formados por las cepas P2, UM1 y A4 en los días 2 y 5 de incubación en LB.

OA

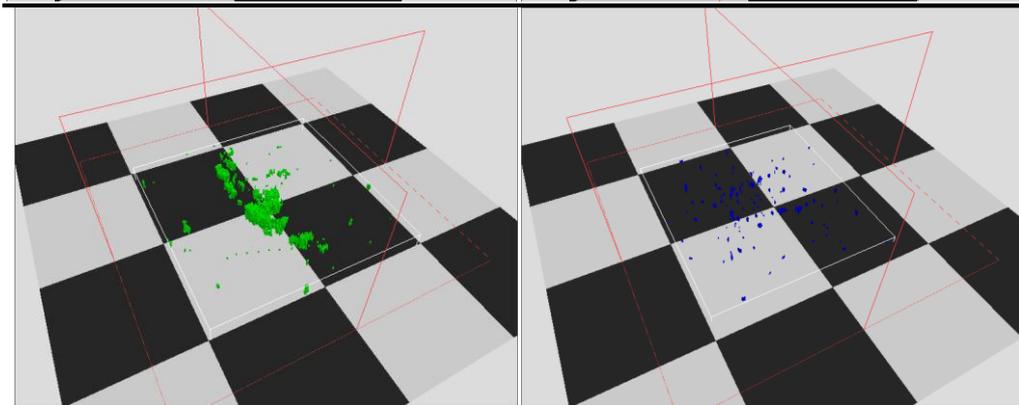
Día 2

Día 5

P. mirabilis Pr2921



P. mirabilis AF



P. mirabilis MSD2

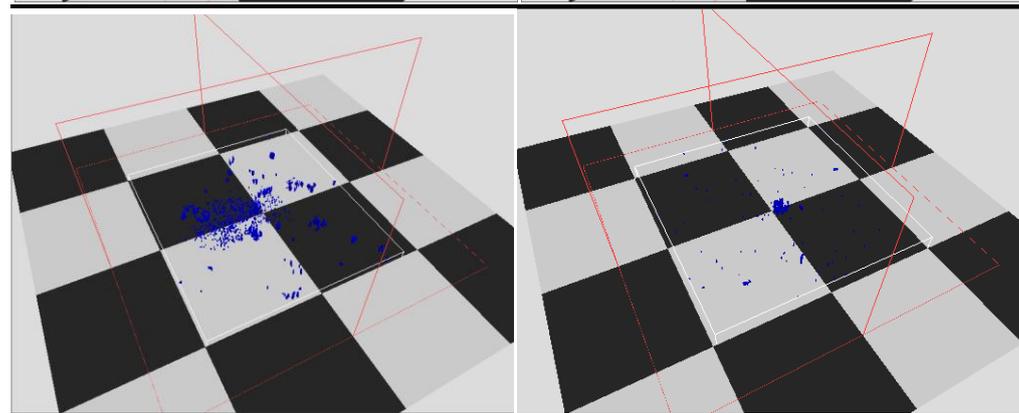


Figura 15: Modelos tridimensionales de los biofilms formados por las cepas Pr2921, AF y MSD2 en los días 2 y 5 de incubación en OA.

OA

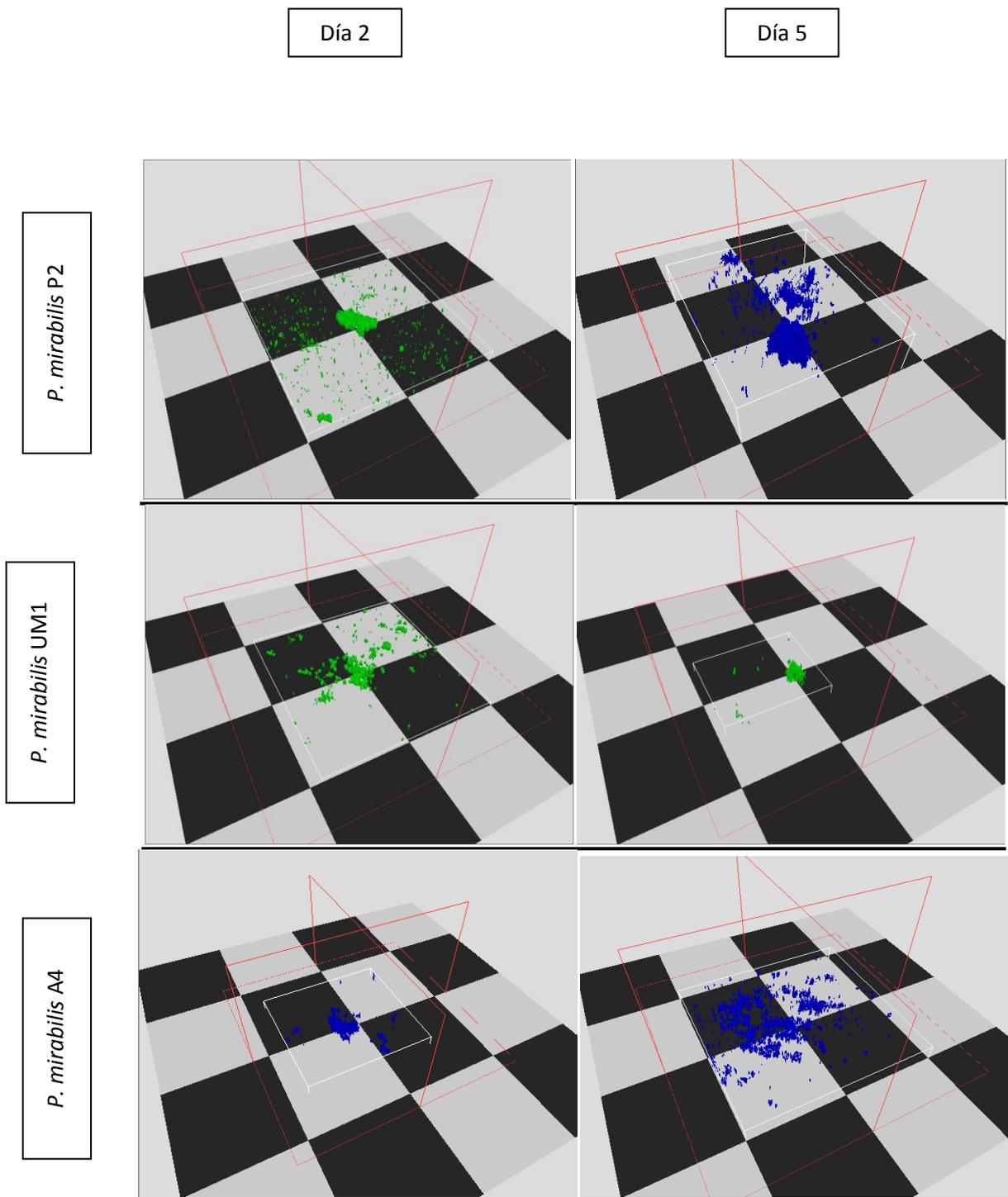


Figura 16: Modelos tridimensionales de los biofilms formados por las cepas P2, UM1 y A4 en los días 2 y 5 de incubación en OA.

DISCUSIÓN

Los biofilms son comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia, que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms son relevantes en diversos contextos, en particular en el ámbito médico y clínico donde se asocian a diversos tipos de infecciones crónicas y a aquellas causadas por implantes médicos (Costerton et al., 1999).

Entre los implantes médicos más comúnmente usados se ubican los catéteres urinarios (Darouiche, 2001). La relevancia clínica del uso de catéteres se manifiesta en el desarrollo de infecciones urinarias, que afectan muy frecuentemente a pacientes que se encuentran bajo cateterización prolongada. Estas infecciones están asociadas a la formación de biofilms en la superficie de los catéteres, y pueden causar cistitis y complicaciones serias como pielonefritis, bacteriemia y formación de cálculos, los cuales se asocian a bloqueo de los catéteres y daño severo en el parénquima renal (Rozalski et al., 1997; Trautner & Darouiche, 2004; Coker et al., 2000).

Varios trabajos han descrito la formación de un biofilm como un proceso secuencial altamente regulado compuesto por varias etapas diferenciadas en las cuales están implicados diversos factores bacterianos, incluyendo flagelos, adhesinas fimbriales y no fimbriales, exopolisacáridos y otros (Davey & O'Toole, 2000; Costerton et al., 2003).

Proteus mirabilis es una bacteria Gram negativa móvil, que infecta preferentemente el tracto urinario superior causando ITU recurrentes y complicadas (Foxman, 2003; Mathai et al., 2001; Scavone, 2006; Song & Abraham, 2008).

P. mirabilis es capaz de formar biofilms en catéteres urinarios (Hall-Stoodley et al., 2004; Gilbert et al., 1997; Nichols et al., 1988). Diversos tipos de fimbrias

están potencialmente vinculados con la adhesión mientras que los flagelos son responsables de la movilidad bacteriana, por lo que estas estructuras podrían asociarse con la formación de biofilms (Nichols et al., 1988).

El objetivo del presente trabajo consistió en caracterizar los biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno en orina artificial (OA) y evaluar el papel de flagelos y fimbrias, factores potencialmente asociados a su urovirulencia, en su formación y desarrollo.

Para cumplir con estos fines se utilizó una cepa salvaje aislada de un caso clínico y cinco mutantes isogénicas incapaces de expresar flagelos y distintos tipos de fimbrias.

Análisis del crecimiento de *P. mirabilis* en orina artificial

Múltiples estudios muestran que la adhesión inicial de los microorganismos a una superficie se ve influida por las condiciones ambientales, afectando el proceso de formación de los biofilms (Fletcher & Pringle, 1986; Nyvad & Kilian, 1990; O'Toole et al., 2000; Poulsen et al., 1993; Wang et al., 1996; Fletcher, 1996; O'Toole & Kolter, 1998; Pratt & Kolter, 1998). Con respecto a *P. mirabilis* en particular, Stickler y colaboradores observaron que la estructura de los biofilms de este microorganismo varía según el medio de cultivo empleado (Stickler et al., 2008).

Teniendo en cuenta estos datos, en el presente trabajo se empleó orina artificial como medio de cultivo con el fin de proveer al microorganismo estudiado de condiciones ambientales similares a las encontradas en la orina humana. Las gráficas de crecimiento de *P. mirabilis* en LB y OA se realizaron con el objetivo de comparar el crecimiento del microorganismo en ambos medios.

Todas las cepas presentaron un comportamiento similar en ambos medios de cultivo, por lo que las mutaciones en flagelos y fimbrias no afectaron el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, la evolución de la concentración bacteriana que se observa en LB y OA estaría influenciada por la distinta naturaleza de los medios, ya que tanto las condiciones de incubación como el inóculo fueron los mismos en todos los casos.

P. mirabilis expresa la enzima ureasa, la cual cataliza la hidrólisis de urea en dióxido de carbono y amoníaco. La acumulación de este último provoca una alcalinización progresiva del medio, la cual se ve evidenciada por el aumento de pH en función del tiempo observado en este trabajo. Previamente, Jones y colaboradores (Jones et al., 2007) realizaron medidas del pH de la OA en función del tiempo de incubación de *P. mirabilis* en este medio, obteniendo resultados muy similares. Brooks y Keevil propusieron en un estudio anterior que el aumento de pH sería la causa del crecimiento limitado del microorganismo en orina artificial (Brooks & Keevil, 1997). Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Evaluación del papel de flagelos y fimbrias en la formación y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno

Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

El primer paso en el proceso de formación de un biofilm es la adhesión reversible de las bacterias a una superficie. Dicha adhesión depende en gran medida de interacciones hidrofóbicas, por lo que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana juega un rol esencial en este proceso.

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación del índice de hidrofobicidad indicarían que el medio en el que es cultivado el microorganismo ejerce cierta influencia sobre las características de la superficie bacteriana, ya que los valores de cada cepa variaron de un medio a otro.

Estas observaciones concuerdan con estudios realizados previamente en los que se determinó que ciertos factores ambientales serían responsables de desencadenar cambios en la expresión génica de las bacterias que provocan la transición de la vida planctónica a la vida en superficie, la cual comienza con la

adhesión (Fletcher & Pringle, 1986; Nyvad & Kilian, 1990; O'Toole et al., 2000; Poulsen et al., 1993; Wang et al., 1996; Fletcher, 1996; O'Toole & Kolter, 1998; Pratt & Kolter, 1998).

Jacobs y Chenia (Jacobs & Chenia, 2011) desarrollaron un criterio de clasificación de microorganismos según la hidrofobicidad de su superficie: las bacterias con un índice de hidrofobicidad superior al 50% poseen una superficie fuertemente hidrofóbica; la superficie de aquellas cuyo índice se encuentra entre el 20 y el 50% es moderadamente hidrofóbica, mientras que las que tienen un índice menor al 20% poseen una superficie hidrofílica.

Siguiendo este criterio, tanto la cepa aflagelada como la mutante en fimbrias PMF mostraron tener una superficie fuertemente hidrofóbica al ser cultivadas en orina artificial. Por lo tanto, la ausencia de estos factores contribuiría a aumentar la hidrofobicidad de superficie de *P. mirabilis*.

Al igual que la cepa salvaje Pr2921, la superficie de la cepa mutante en fimbrias ATF resultó moderadamente hidrofóbica, mientras que las cepas mutantes en fimbrias MR/P y UCA presentaron superficies hidrofílicas en orina artificial. Estos resultados muestran que los distintos tipos de fimbrias así como los flagelos afectan la hidrofobicidad de superficie de *P. mirabilis*.

El mismo ensayo fue llevado a cabo previamente en el Departamento de Microbiología del IIBCE, empleando las mismas cepas que en el presente estudio (con excepción de la mutante flagelar AF) cultivadas en LB (Schlapp, 2009). Los resultados de Schlapp mostraron que en este medio los índices de las cepas mutantes en fimbrias PMF y UCA fueron significativamente mayores que los de la cepa salvaje (Schlapp, 2009). En este trabajo, sin embargo, ninguna de estas mutantes presentó diferencias significativas con la cepa salvaje con respecto a su índice de hidrofobicidad en LB.

Determinación de la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas

La presencia de fimbrias y flagelos influyen en la velocidad y la extensión de la adhesión de las células bacterianas, por lo que estas estructuras de superficie podrían estar involucradas en las etapas iniciales de la formación de los biofilms (Donlan, 2002; O'Toole & Kolter, 1998). El uso de cepas mutantes ha sido crucial para estudiar esta relación en el laboratorio.

Adhesión a poliestireno

El hecho de que la adhesión de las bacterias a una superficie no sea igual en los medios empleados en el presente trabajo confirma que el ambiente en el que crece el microorganismo influye sobre su capacidad de adhesión (O'Toole et al., 2000; Katsikogianni & Missirlis, 2004). Al igual que los resultados del ensayo de hidrofobicidad estas observaciones coinciden con trabajos previos de otros investigadores que proponen que la expresión de algunos componentes bacterianos que facilitan la vida bajo la forma de biofilms (como podrían serlo fimbrias y flagelos) está también influida por el medio en el que crecen los microorganismos (Fletcher & Pringle, 1986; Nyvad & Kilian, 1990; O'Toole et al., 2000; O'Toole & Kolter, 1998; Poulsen et al., 1993; Wang et al., 1996; Fletcher, 1996; Pratt & Kolter, 1998).

En la mayoría de los casos, las cepas mutantes presentaron a las 24 horas de incubación valores de adhesión a poliestireno iguales o significativamente mayores que los de la cepa salvaje en orina artificial y LB respectivamente, lo que indicaría que los flagelos y las fimbrias individualmente no serían indispensables para la formación de biofilms en orina artificial. Por otro lado, en LB las cepas mutantes en fimbrias MR/P, PMF y UCA serían capaces de adherirse a poliestireno en mayor proporción que la cepa salvaje, por lo que la ausencia de cada uno de estos tipos de fimbrias sería ventajosa para *P. mirabilis* al momento de llevar a cabo este proceso.

Rocha y colaboradores (Rocha et al., 2007) sugieren que la capacidad de *P. mirabilis* de adherirse a poliestireno podría ser importante para el establecimiento de las ITU en pacientes cateterizados, y que la colonización de vejiga y riñones es multifactorial y varios tipos de fimbrias podrían cooperar en este proceso.

Adhesión a vidrio

Al igual que en el ensayo llevado a cabo sobre poliestireno, la adhesión bacteriana a vidrio resultó diferente en LB que en OA.

Con respecto a las diferencias entre cepas, es interesante destacar que todas las cepas mutantes presentaron una adhesión a vidrio significativamente superior a la de la cepa salvaje en OA. Teniendo en cuenta que el ensayo de hidrofobicidad en OA mostró que la mutante flagelar presenta una superficie fuertemente hidrofóbica, la mutante en fimbrias ATF tendría una superficie moderadamente hidrofóbica y la mutante en fimbrias UCA una superficie hidrofílica, y que los valores de adhesión de las tres cepas resultaron particularmente elevados en este medio en comparación con la cepa salvaje, podemos sugerir que la adhesión de *P. mirabilis* a vidrio estaría influenciada por varios factores y no únicamente por la hidrofobicidad de la superficie bacteriana.

Pompilio y colaboradores (Pompilio et al., 2008) observaron que a pesar de que la hidrofobicidad de la superficie bacteriana está involucrada tanto en la adhesión como en la formación de biofilms de *Stenotrophomonas maltophilia*, no sería el único factor que regula estos procesos. Asimismo, en el trabajo de Jacobs y Chenia (Jacobs & Chenia, 2011) los autores proponen que la adhesión no dependería de la hidrofobicidad.

Los resultados del presente trabajo, sin embargo, no permitieron establecer una relación entre la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y la capacidad de adhesión.

Comparación en la formación de biofilms sobre vidrio y poliestireno

Numerosos trabajos indican que los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies no polares que a superficies hidrofílicas (Donlan, 2002; Pringle et al., 1983; Bendinger et al., 1993; Mittelman, 1996). Los resultados del presente trabajo confirmarían esta hipótesis para LB, ya que en este medio las cepas tendieron a adherirse significativamente más a poliestireno que a vidrio durante el mismo tiempo de incubación.

Por otro lado, la adhesión de las cepas mutantes en flagelos, fimbrias MR/P y fimbrias PMF a ambas superficies fue similar cuando las bacterias se incubaron en OA. En el caso de las mutantes en flagelos, fimbrias MR/P y PMF los valores de adhesión no se vieron afectados significativamente con respecto a los de la cepa salvaje.

Caracterización de la formación y arquitectura de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno

El estudio de los biofilms se ha visto limitado por la dificultad de analizar estas comunidades microbianas en su estado natural, debido a que las aproximaciones experimentales tradicionalmente empleadas implican la fijación, deshidratación de la muestra, lo cual reduce o elimina características esenciales de estos sistemas como lo son la estructura y organización de los mismos (Lawrence et al., 1998).

Diversos métodos han sido empleados con el fin de analizar los biofilms en su estado original, de los cuáles las más exitosas han sido las técnicas de microscopía. Una de las más versátiles y efectivas es la MLC, que permite el análisis detallado y no destructivo de biofilms microbianos gruesos y completamente hidratados (Lawrence et al., 1998).

Las secciones ópticas eliminan la información fuera de foco y permiten obtener imágenes digitales claras y nítidas con mejor resolución. Estas características posibilitan que las imágenes sean procesadas y analizadas, permitiendo al usuario obtener información cuantitativa y realizar reconstrucciones tridimensionales de los biofilms (Lawrence et al., 1998).

Cálculo de parámetros

Número de bacterias

Los resultados del cálculo del número de bacterias muestran que el parámetro presentó una mayor variación a lo largo del tiempo cuando las cepas fueron cultivadas en LB con respecto al crecimiento en OA. La disponibilidad de nutrientes es una de las diferencias principales entre estos medios, ya que el LB es un medio rico mientras que la OA es un medio mínimo, por lo que ésta podría ser un factor capaz de afectar el crecimiento bacteriano bajo la forma de biofilms.

Las diferencias entre el número de bacterias de las cepas mutantes con respecto a la salvaje indicarían que los flagelos y fimbrias son factores que influyen sobre este parámetro. En LB, la ausencia de fimbrias MR/P afecta notoriamente la capacidad de *P. mirabilis* de alcanzar números elevados de bacterias en el biofilm, mientras que la ausencia de fimbrias UCA, por el contrario, potenciaría este proceso.

Volumen total de bacterias

Al igual que en el caso del número de bacterias, los valores de este parámetro obtenidos en OA resultaron menores que aquellos obtenidos en LB. De forma similar al caso anterior, el volumen total de bacterias mostró una variación más marcada a lo largo del tiempo cuando el medio de cultivo utilizado fue LB.

La ausencia de fimbrias MR/P disminuye notoriamente el volumen total de bacterias que logra alcanzar *P. mirabilis* a lo largo de los 7 días de incubación

en relación a la cepa salvaje, tanto en OA como en LB. Estos datos coinciden con los resultados de Schlapp (Schlapp, 2009) y sugieren que este tipo de fimbrias cumple una función en la formación y desarrollo de los biofilms, probablemente relacionada a la adhesión entre las distintas células bacterianas. Jansen y colaboradores (Jansen et al., 2004) sugirieron numerosas ventajas que esta capacidad de autoagregación le aportaría a las bacterias, como evasión del sistema inmune y una mayor facilidad de intercambio de moléculas señalizadoras (*quórum sensing*) y de adhesión a superficies. Estos autores notaron que la expresión constitutiva de fimbrias MR/P en *P. mirabilis* potencia el desarrollo del biofilm durante las primeras 48 horas. Para explicar estas observaciones, Jansen y colaboradores propusieron que este tipo de fimbrias permitiría a las bacterias autoagregarse, acelerando las primeras etapas del proceso de desarrollo.

Por otro lado, los flagelos y los restantes tipos de fimbrias ensayados no serían necesarios para que el biofilm alcance un volumen elevado de bacterias, sino que en LB la falta de fimbrias UCA y ATF incluso potencia el volumen bacteriano total del biofilm en relación a la cepa salvaje. Una explicación posible es que estas estructuras al estar presentes podrían enmascarar sitios de la superficie bacteriana que permitirían a los microorganismos adherirse entre sí. Una hipótesis similar fue planteada por Pompilio y colaboradores en su trabajo con *Stenotrophomonas maltophilia* para explicar la falta de una correlación positiva entre la hidrofobicidad y la movilidad de la bacteria.

Volumen total cubierto

Los resultados del cálculo del volumen total cubierto en cada medio mostraron que se produce una mayor variación del parámetro a lo largo del tiempo en LB que en OA y que el mismo es significativamente superior en este medio que en OA en muchos de los casos ensayados. Además, las cepas mutantes difirieron en mayor medida con respecto a la cepa salvaje cuando se utilizó LB como medio de cultivo.

La cepa mutante en fimbrias MR/P mostró menor volumen total cubierto que la cepa salvaje a lo largo de todo el tiempo de incubación, lo que confirma que este tipo de fimbrias sería importante para la formación y posteriores etapas del biofilm. Estas observaciones coinciden una vez más con el trabajo de Jansen y colaboradores, quienes notaron que la formación de biofilms en ausencia de MR/P se ve disminuida pero no impedida.

Este no sería el caso de los flagelos y los restantes tipos de fimbrias ensayados, ya que las cepas incapaces de expresar estas estructuras no presentaron un volumen total cubierto disminuido, sino incluso superior al de la cepa salvaje en varios casos. Estas observaciones indican que a pesar de que la ausencia de flagelos y fimbrias PMF, UCA y ATF no impide la formación de biofilms, propiedades como el volumen y la forma de los mismos se ven alteradas al no estar presentes estas estructuras.

Chiang y Burrows observaron que cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* incapaces de generar movimiento *twitching* forman biofilms que poseen una estructura tridimensional de “hongo” grande y definida (Chiang & Burrows, 2003). Por otro lado, los biofilms de la cepa salvaje se distribuyen de manera más uniforme en la superficie de adhesión. Para explicar estos resultados, los autores propusieron que las fimbrias de tipo IV, responsables del movimiento *twitching*, podrían ser importantes para la colonización de todo el sustrato, y que la ausencia del movimiento *twitching* provocaría el desarrollo de microcolonias localizadas y de tamaño desproporcionado.

Los resultados de este trabajo permitieron apreciar que las cepas mutantes en fimbrias UCA, PMF y ATF forman biofilms de características similares a las descritas por Chiang y Burrows, por lo que es posible que en *P. mirabilis* estos tres tipos de fimbrias cumplan funciones análogas a las de las fimbrias de tipo IV en *P. aeruginosa*.

El comportamiento del parámetro fue similar para varias de las cepas, lo que refuerza la idea de que el biofilm se desarrolla siguiendo las mismas etapas en todas ellas.

Construcción de modelos 3D de biofilms

A partir de los modelos 3D de los biofilms fue posible visualizar diferencias entre uno y otro medio con respecto a la estructura así como a la cantidad de bacterias que componen los mismos.

Mientras que los biofilms formados en LB presentan una estructura tridimensional característica en forma de “hongo”, los que se formaron en OA poseen una forma más achatada. Estas diferencias de estructura fueron observadas previamente en *P. mirabilis* por Jones y colaboradores, quienes propusieron que sería causada por la falta de nutrientes en la OA (Jones et al., 2007).

Con respecto a la cantidad y volumen bacteriano de los biofilms, los modelos muestran las mismas diferencias entre las cepas mutantes y la salvaje que se apreciaron en el cálculo de parámetros. Asimismo, las imágenes obtenidas mediante MLC permitieron observar que los biofilms formados por las cepas mutantes diferían en su estructura tridimensional de aquellos formados por la cepa salvaje.

A pesar de estas diferencias, todas las cepas mutantes fueron capaces de formar biofilms en ambos medios. Por lo tanto, a pesar de que la falta de flagelos y fimbrias no evitaría que *P. mirabilis* forme biofilms, estas estructuras cumplirían un rol en el proceso de desarrollo de los mismos, afectando su estructura tridimensional.

Se puede concluir que la MLC probó ser una herramienta muy valiosa en el estudio de los biofilms de *P. mirabilis*, ya que permitió complementar los resultados obtenidos en los otros ensayos con la visualización directa de los biofilms hidratados, lo cual no es posible lograr empleando técnicas diferentes de microscopía que requieren el tratamiento de la muestra previamente a su visualización.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio permitieron concluir que el medio en el que es cultivado *P. mirabilis* afectaría propiedades de superficie tales como su hidrofobicidad y su capacidad de adhesión. Estas propiedades están asociadas a los primeros estadios del proceso de formación de biofilms, por lo que el medio de cultivo influiría también sobre el mismo.

La ausencia de las fimbrias MR/P afectó la formación de biofilms de *P. mirabilis*, por lo que estas estructuras cumplirían una función en este proceso. Individualmente, ni los flagelos ni los otros tipos de fimbrias ensayados serían indispensables para que *P. mirabilis* forme biofilms, aunque podrían jugar un rol relacionado con su estructura y estabilidad.

Teniendo en cuenta que las condiciones del medio afectan fuertemente la formación y desarrollo de los biofilms bacterianos, se propone caracterizar la formación de biofilms de *P. mirabilis* en un sistema de flujo continuo. Asimismo, se pretende comparar mediante técnicas moleculares la expresión génica diferencial en *P. mirabilis* formando biofilms con respecto a su contraparte planctónica.

REFERENCIAS

1. Adal K. A. & Farr B. M., 1996. Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12:208-13
2. Archibald L. K. & Gaynes R. P., 1997. Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Nosocom Infect.*11:245-55
3. Bashan & Levanony, 1988. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to light-textured soil by protein bridging. *J. Gen. Microbiol.* 134:2269-2279
4. Bahrani F. K. et al., 1993. *Proteus mirabilis* fimbriae: N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the genes from two strains. *Infect. Immun.* 61:884-91
5. Beenken et al, 2004. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *J. Bacteriol.* 186:4665-84.
6. Beloin C.& Ghigo J. M., 2005. Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends Microbiol.* 13:16-19.
7. Bendinger et al., 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3973-77
8. Bibiloni *et al.*, 2001. *Methods in Enzymology. Microbial growth in biofilms part A* (ed.). Doyle, R.J. New.York: Academic Press.
9. Belas R., 1992. The swarming phenomenon of *Proteus mirabilis*. *ASM News* 58:15-22
10. Belas R. & Suvanasuthi R., 2005. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J. Bacteriol.* 187:6789-6803
11. Brady *et al.*, 2007. Immunoglobulins to surface-associated biofilm immunogens provide a novel means of visualization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6612-19

12. Breitenbach J. M. & Hausinger R. P., 1988. *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. *Biochem. J.* 250:917-20
13. Brooks T. & Keevil C. W., 1997. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 203-206
14. Burke et al., 1981. Prevention of catéter-associated urinary tract infections. Efficacy of daily meatal care regimens. *Am. J. Med.* 70:655-58
15. Chalmers *et al.*, 2008. Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. Community micromanipulated from dental plaque. *J. Bacteriol.* 190:8145-54
16. Characklis W. G., 1990. Biofilm processes, p.195-232. *En* W. G. Characklis & K. C. Marshall (ed.) *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
17. Characklis et al., 1990. Physiological ecology in biofilm systems. *En* Characklis et al., editores. *Biofilms*. New York: John Wiley & Sons; p.341-94
18. Characklis et al., 1990. Physiological ecology in biofilm systems, p. 341-94. *En* W. G. Characklis & K. C. Marshall (ed.) *Biofilms*. John Wiley & Sons, New York, N.Y.
19. Chiang P. & Burrows L. L., 2003. Biofilm formation by hyperpilated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185:2374-78
1. Chow A. W., et al., 1979. A nosocomial outbreak of infections due to multiple resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. *J. Infect. Dis.* 139:621-27
2. Clegg S. & Gerlach G. F., 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* 169:934-38
3. Coker et al., 2000. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microb.Infec.*2:1497-1505
4. Corpe W. A., 1980. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces, p. 105-144. *En* G. Bitton and K. C. Marshall (ed.) *Adsorption of microorganisms to surfaces*. John Wiley & Sons, New York, NY
5. Costerton J. W., 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15:435-64

6. Costerton J. W. *et al.*, 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-45
7. Costerton J. W. *et al.*, 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:318-22
8. Costerton J. W. *et al.*, 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112:1466-77
9. Cramton *et al.*, 1999. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immunol.* 67:5427-33.
10. Daifuku R. & Stamm W. E., 1986. Bacterial adherence to bladder uroepithelial cells in catheter-associated urinary tract infection. *N. Engl. J. Med.* 314:1208-13
11. Danielsson *et al.*, 1977. On bacterial adhesion - the effect of certain enzymes on adhered cells in a marine *Pseudomonas sp.* *Bot. Marina.* 20:13-17
12. Darouiche R. O., 2001. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin. Infect. Dis.* 33:1567-72
13. Davey M. E. & O'Toole G. A., 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:847-67
14. de Beer *et al.*, 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43:1131-38
15. de Beer & Stoodley, 1995. Relation between the structure of an aerobic biofilm and mass transport phenomena. *Water Sci. Technol.* 32:11-18
16. Decho A. W., 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 28:73-153
17. Dickinson M. & Bisno A. L., 1993. Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int. J. Artif. Organs* 16:749-54
18. Donlan R. M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Diseases* 8: 881-90
19. Donlan R. M. & Costerton J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167-93

20. Ehlers L. J. & Bouwer E. J., 1999. RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Sci. Technol.* 7:163-171
21. Flemming H. C., 1993. Biofilms and environmental protection. *Water Sci. Technol.* 27:1-10
22. Flemming *et al.*, 2000. Physico-chemical properties of biofilms. En: Evans, L.V., editor. *Biofilms: recent advances in their study and control.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers. p. 19-34
23. Fletcher M. *et al.*, 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:67-72
24. Fletcher M. & Pringle J. H., 1986 Influence of substratum hydration and absorbed macromolecules on bacterial attachment to surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 51:1321–25
25. Fletcher M., 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surfaces and adhesion strategies. In: Fletcher M, editor. *Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity.* New York, N.Y: John Wiley & Sons, Inc.; pp. 1–24
26. Foxman B., 2003. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis.Mon.*49(2):53-70
27. Garibaldi R. A. *et al.*, 1980. Meatal colonization and catéter-associated bacteriuria. *N. Engl. J. Med.* 303:316-18
28. Ghigo J. M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; 412:442-45
29. Gilbert *et al.*, 1997. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11:160-67
30. Gotz F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43:1367-78
31. Griffith D. P. *et al.*, 1976. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. *Investig. Urol.* 13:346-50
32. Hall-Stoodley *et al.*, 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95-108
33. Hartstein *et al.*, 1981. Nosocomial urinary tract infection: a prospective evaluation of 108 catheterized patients. *Infect. Control* 2:380-86

34. Hashmi S. et al., 2003. Urinary tract infection in surgical patients. *Am. J. Surg.* 186:53-56
35. Hausner M. & Wuertz S., 1999. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3710-13
36. Hawthorn L. & Reid G., 1990. The effect of protein and urine on uropathogen adhesion to polymer substrata. *J. Biomed. Mater. Res.* 24:1325-32
37. Heilmann et al., 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20:1083-91.
38. Heydorn et al., 2002. Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2008-17.
39. Hinsa et al., 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol. Microbiol.* 49:905-18
40. Hoyle B. D. et al., 1992. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2054-56
41. Image-Pro® Plus, Version 5.0 for Windows™ , Start-Up Guide. Media Cybernetics Inc., USA
42. Jacobs A. & Chenia H. Y., 2011. Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromis mossambicus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 10:16
43. Jacobsen et al., 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21:26-59
44. Jain et al., 1995. Overuse of the indwelling urinary tract catheter in hospitalized medical patients. *Arch. Intern. Med.* 155:1425-29
45. Jansen et al., 2004. Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in

- vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infect. Immun.* 72:7294-7305
46. Jarvis W. R., 1996. Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17:552-57
 47. Jones B. D. et al., 2007. Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiol. Lett.* 268:16-21
 48. Jones B. D. & Mobley H. L., 1987. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella* species isolated from urinary tract infection. *Infect. Immun.* 55:2198-2203
 49. Katsikogianni M. & Missirlis Y. F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cells Mater.* 8:37-57
 50. Kaye & Hesson, 1994. Infections associated with foreign objects in the urinary tract, p. 291-307. *En Bisno, A.L. & Waldvogel, A. (ed.), Infections associated with indwelling medical devices, 2nd. ed. American Society for Microbiology, Washington D.C*
 51. Klausen et al., 2003(a). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 48:1511-24.
 52. Korber et al., 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot⁺ and Mot⁻ *Pseudomonas fluorescens*. *Microb. Ecol.* 1989;18:1-19
 53. Kraiden S. et al., 1987. Expanded clinical spectrum of infections caused by *Proteus penneri*. *J. Clin. Microbiol.* 25:578-79
 54. Kunin C. M., 1987. Detection, prevention and management of urinary tract infections, 4th edition, p. 245-88. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
 55. Latasa et al., 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Mol. Microbiol.* 58:1322-39
 56. Lawrence et al., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173: 6558-67

57. Lawrence et al., 1998. Study of biofilms using Confocal Laser Scanning Microscopy. *En Digital Image Analysis of Microbes: Imaging, Morphometry, Fluorometry and Motility Techniques and Applications*. Edited by M. H. F. Wilkinson & F. Shut. John Wiley & Sons Ltd
58. Leranoz S. et al., 1997. New fimbrial adhesins of *Serratia marcescens* isolated from urinary tract infections: description and properties. *J. Urol.* 157:694-98
59. Maki D. G. & Tambyah P. A., 2001. Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg. Infect. Dis.* 7:342-47
60. Mathai et al., 2001. Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40:129-36
61. Massad G. et al., 1996. *Proteus mirabilis* ambient-temperature fimbriae: cloning and nucleotide sequence of the *aft* gene cluster. *Infect. Immun.* 64:4390-95.
62. McLean et al., 1995. Biofilm associated urinary tract infections, p. 261-73. *En Lappin-Scott, H. M. & Costerton, J. W. (ed.), Microbial biofilms.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
63. Mittelman M.W., 1996. Adhesion to biomaterials. *En: Fletcher M., editor. Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity.* New York: Wiley-Liss, Inc.; p. 89-127
64. Mobley H. L. & Belas R., 1995. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends Microbiol.* 3:280-84
65. Moore et al., 2002. Pathogenesis of urinary tract infections: a review. *J. Clin. Nurs.* 11:568-74
66. Musher D. M. et al., 1975. Role of urease in pyelonephritis resulting from urinary tract infection with *Proteus*. *J. Infect. Dis.* 131:177-81
67. Nadell et al., 2008. Sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 206-24
68. Nickel et al., 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:619-24

69. Nichols et al., 1988. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:518-23
70. Nichols et al., 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 135:1291-1303
71. Niel-Weise & van der Broek, 2005. Urinary catheter policies for long term bladder drainage. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2005:CD004201
72. Nielubowicz G. R. & Mobley H. L. T., 2010. *Nat. Rev. Urol.* 7: 430-41
73. Nyvad B. & Kilian M., 1990. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 24:267–27
74. Old D. C. & Adegbola R. A., 1982. Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. *J. Med. Microbiol.* 15:551-64
75. Old D. C. et al., 1983. Multiple fimbrial haemagglutinins in *Serratia* species. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)* 172:107-15
76. O'Toole G. A. & Kolter R., 1998. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 28:449–61
77. O'Toole G. A. & Kolter R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* 30:295–304
78. O'Toole G. A. et al, 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79
79. O'Toole et al., 2000. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 182:425–43
80. Parton R. M. y Davis I., 2004. "Lifting the fog: Image Restoration by deconvolution". En: Celis J.L., "Cell Biology: A Laboratory Handbook". 3era ed., Cap. 19. San Diego: Academic Press.)
81. Penner J. L., 1984. Genus XI *Proteus*, p. 491-494. En N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systemic bacteriology*, vol 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD

- 82.** Penner J. L., 1992. The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*, p. 2849-2853. En I. Balows, G. Truper, W. Harder, and K. Schleifer (ed.), The prokaryotes, vol III. Springer-Verlag KG, Berlin, Alemania.
- 83.** Pompilio et al., 2008. Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol. Lett. 287:41-47
- 84.** Pratt L. A. & Kolter R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol Microbiol. 30:285-94
- 85.** Pringle et al., 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 45:811-17
- 86.** Poulsen et al., 1993. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl Environ Microbiol. 59:1354-60
- 87.** Rather P. N., 2005. Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. Environ. Microbiol. 7:1065-73
- 88.** Reisner et al., 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. Mol. Microbiol. 48:933-46.
- 89.** Roberts et al., 1999. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397, in a model oral biofilm. FEMS Microbiol. Lett. 177:63-66
- 90.** Rocha et al., 2007. Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 51:319-26
- 91.** Rosenberg & Kjelleberg, 1986. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology. 9:353-93
- 92.** Rozalski A. et al., 1997. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:65-89.
- 93.** Scavone P., 2006. Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología.
- 94.** Schembri et al., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. Mol. Microbiol. 48:253-67.
- 95.** Schlapp G., 2009. Biofilms de *Proteus mirabilis* uropatogénico: etapas de formación y papel y flagelos. Tesis de Maestría, PEDECIBA Biología

96. Schlapp G. *et al.*, 2011. Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms – A quantitative confocal microscopy approach. *J. Microbiol. Methods* 87:234-40
97. Schoolnik *et al.*, 2001. Whole genome DNA microarray development by *Vibrio cholerae* 01 El Tor. *Methods Enzymol.* 336:3-18.
98. Scott T. G., 1960. The bacteriology of urinary infections in paraplegia. *J. Clin. Pathol.* 13:54-57
99. Song J. & Abraham S.N., 2008. Innate and adaptative immune responses in the urinary tract. *Eur. J. Clin. Invest.* 38:21-28.
100. Soriano *et al.*, 2009. *J. Antimicrob. Chemother* 63:353-56
101. Stamm W. E., 1991. Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. *Am. J. Med.* 91:65S-71S
102. Stamm & Hooton, 1993. Management of urinary tract infections in adults. *N. Engl. J. Med.* 329:1328-34.
103. Stanley N. R. & Lazazzera B. A., 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 52:917-24
104. Stickler & Zimakoff, 1994. Complications of urinary tract infections associated with devices used for long term bladder management. *J. Hosp. Infect.* 28:177-94
105. Stickler D. J., 1996. Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling* 94:293-305
106. Stickler D. J. *et al.*, 2008. Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3486-90
107. Stickler D. J. *et al.*, 2006. Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 100:1028-33
108. Stickler D. J. & Morgan S. D., 2006. Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. *J. Med. Microbiol.* 55:498-94
109. Stoodley *et al.*, 1994. Liquid flow in biofilm systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2711-16

110. Sutherland I. W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:7-9
111. Tambyah et al., 1999. A prospective study of pathogenesis of catheter-associated urinary tract infections. *Mayo Clin. Proc.* 74:131-36
112. Tambyah & Maki, 2000. Catheter-associated urinary tract infection is rarely symptomatic: a prospective study of 1,497 catheterized patients. *Arch. Intern. Med.* 160:678-82
113. The mob response, *EMBO reports*, 2008. 9:4
114. Trautner B. W. & Darouiche R. O., 2004. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am. J. Infect. Control.* 32:177-83
115. Wang et al., 1996. Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* genes inducible by respiratory mucus derived from cystic fibrosis patients. *Mol Microbiol.* 22:1005–101
116. Warren J. W. et al., 1982. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *J. Infect. Dis.* 146:719-23
117. Warren J. W. et al., 1987. Fever, bacteriemia, and death as complications of bacteriuria in women with long-term urethral catheters. *J. Infect. Dis.* 155:1151-58.
118. Warren J. W. et al., 1989. The prevalence of urethral catheterization in Maryland nursing homes.
119. Warren J. W., 1996. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. *In* H. L. Mobley and J. W. Warren (ed.) *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management.* ASM Press, Washington, DC
120. Warren J. W., 1997. Catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 11:609-22
121. Warren J. W., 2001. Catheter-associated urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:299-303
122. Watnik P. I., & Kolter R., 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm.
123. Whiteley et al., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860-64.

- 124.** Williams F. D. & Schwarzhoff R. H., 1978. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. Annu. Rev. Microbiol. 32:101-22
- 125.** Wray S. K. et al., 1986. Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesion from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. Infect. Immun. 54:43-49
- 126.** Yamamoto T. et al., 1985. Fimbria-mediated adherence of *Serratia marcescens* strain US5 to human urinary bladder surface. Microbiol. Immunol. 29:677-81
- 127.** Yildiz F. H.& Schoolnik G. K., 1999. *Vibrio cholera* 01 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. PNAS 96:4028-33.
- 128.** Zeiss, C. Principles of Confocal Microscopy
- 129.** Zunino P. et al., 2000. Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 29:137-43
- 130.** Zunino et al., 2001. New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2:113-120
- 131.** Zunino et al., 2003. *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. Microbiology 149:3231-3237

ANEXO I

Número de bacterias

Una vez determinado el número de bacterias presentes en cada campo, se calcularon el promedio y la desviación estándar y a partir de los valores obtenidos para cada cepa se graficó el número de bacterias en función del tiempo de incubación (Figuras 13 a 18).

Pr2921 (Cepa salvaje)

El número de bacterias de Pr2921 se mantuvo constante durante los días 1 y 2 de incubación en LB, y al tercer día aumentó en forma significativa. Al cuarto día se observó una disminución significativa del parámetro, el cual fue en aumento los días 5 y 6 para nuevamente disminuir al día final de incubación.

En OA el único cambio significativo en el número de bacterias fue una disminución al día 5 de incubación (Figura 13), aunque se observaron aumentos lentos en el parámetro hasta el día 4, así como los días 6 y 7.

El valor del parámetro resultó significativamente mayor en LB con respecto a OA los días 1, 3 y 5 de incubación, mientras que en el día 4 se observó el caso contrario (Figura 13).

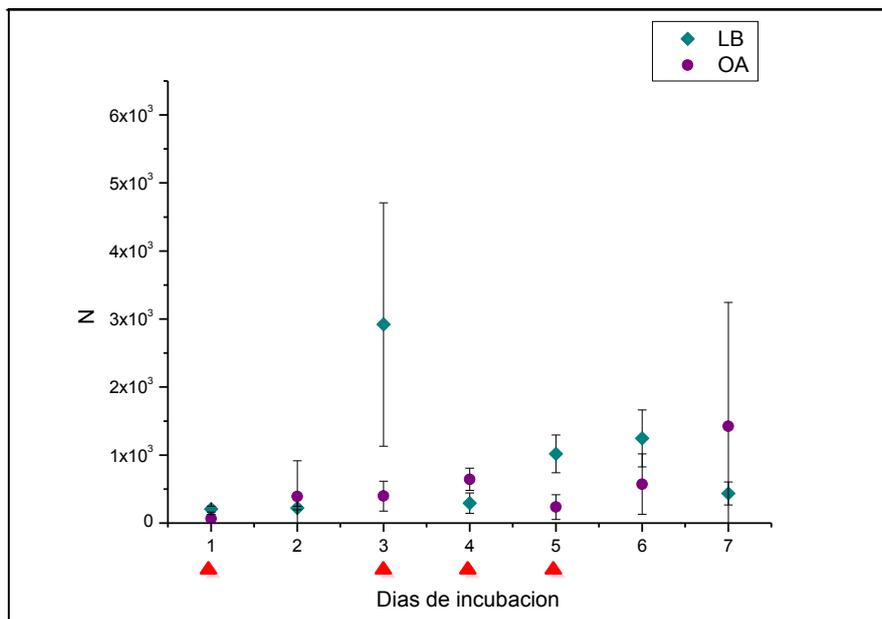


Figura 13: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa salvaje Pr2921. Los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

AF (mutante flagelar)

En el caso de AF el número de bacterias mostró un aumento significativo al segundo día de incubación en LB y disminuyó al tercer día. El parámetro se mantuvo constante durante los días 4 y 5, aumentó significativamente al día 6 y finalmente disminuyó al día 7. En OA no hubo diferencias significativas en el número de bacterias de un día al siguiente (Figura 14).

El número de bacterias de esta cepa resultó significativamente mayor en LB con respecto a OA durante todos los días de incubación (Figura 14).

El número de bacterias de AF resultó significativamente menor que el de la cepa salvaje Pr2921 el primer día de incubación en LB, y significativamente mayor los días 2, 4, 6 y 7. En OA, el valor del parámetro fue significativamente menor que el de Pr2921 el día 4 de incubación (Figura 14).

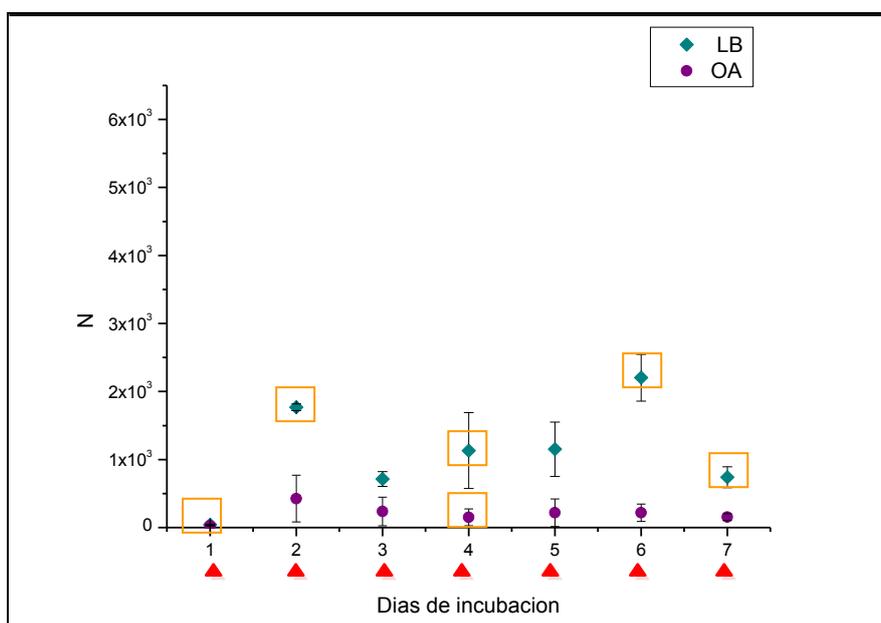


Figura 14: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa mutante flagelar AF. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

MSD2 (Mutante en fimbrias MR/P)

Con respecto al número de bacterias de MSD2, el único cambio significativo que se observó fue un aumento en el parámetro al día 2 de incubación en LB. Cuando la cepa se cultivó en OA el parámetro no varió significativamente de un día al siguiente, aunque se observó un incremento del número de bacterias al día 7 en ambos medios (Figura 15).

Tampoco hubo diferencias significativas entre ambos medios para esta cepa (Figura 15).

En relación a la cepa salvaje, el número de bacterias de MSD2 fue significativamente menor los días 1, 2, 3, 5 y 6 de incubación en LB, así como el cuarto día de incubación en OA (Figura 15).

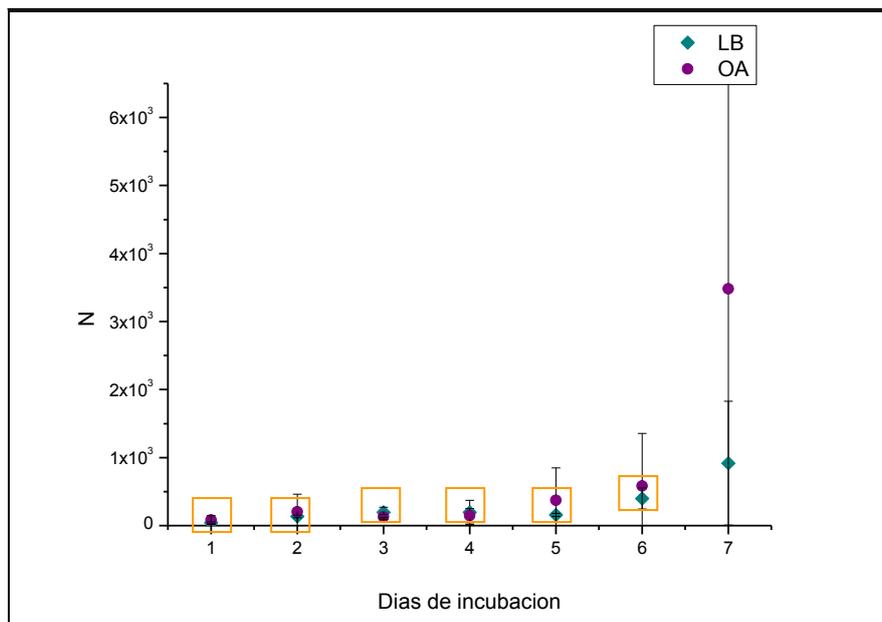


Figura 15: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial MSD2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921.

P2 (mutante en fimbrias PMF)

En LB el número de bacterias de P2 no varió significativamente hasta el día 3 de incubación, cuando disminuyó significativamente. Al día 4 el parámetro aumentó y nuevamente disminuyó al día 5, aunque estos cambios no fueron significativos. Por otro lado, durante los días 6 y 7 el número de bacterias se mantuvo constante. En OA no se observaron cambios significativos en el parámetro hasta el último día de incubación, en el que el número de bacterias disminuyó significativamente (Figura 16).

En el segundo día de incubación el parámetro resultó significativamente mayor en LB que en OA (Figura 16). A diferencia de lo observado en el resto de las cepas, el parámetro resultó mayor en OA con respecto a LB los días 3, 5 y 6 de incubación, a pesar de que estas diferencias no fueron significativas.

El número de bacterias de P2 fue significativamente mayor que el de la cepa salvaje Pr2921 durante los días 1, 2, 4 y 7 de incubación en LB, y significativamente menor los días 3, 5 y 6. En OA, el parámetro resultó significativamente mayor que el de Pr2921 los días 3 y 4 de incubación (Figura 16).

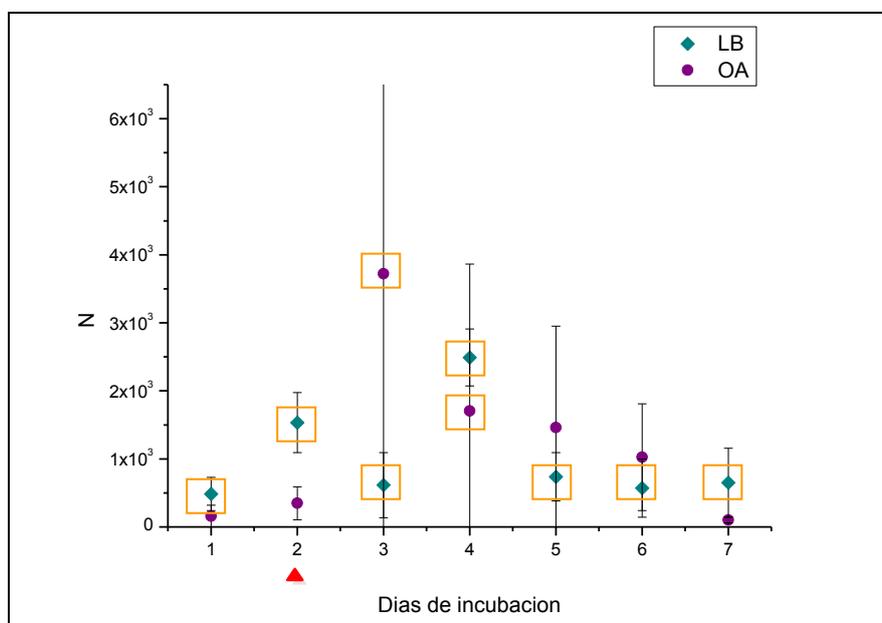


Figura 16: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial P2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

UM1 (mutante en fimbrias UCA)

Si bien el número de bacterias de la cepa UM1 tuvo cierta variación en el tiempo, la misma no fue significativa en ninguno de los casos.

Sin embargo, en los días 4 y 5 de incubación el parámetro resultó significativamente mayor en LB que en OA (Figura 17).

En relación a la cepa salvaje, el número de bacterias de UM1 fue significativamente mayor los días 1, 2, 4, 5 y 6 de incubación en LB, mientras que resultó significativamente menor el cuarto día de incubación en OA (Figura 17).

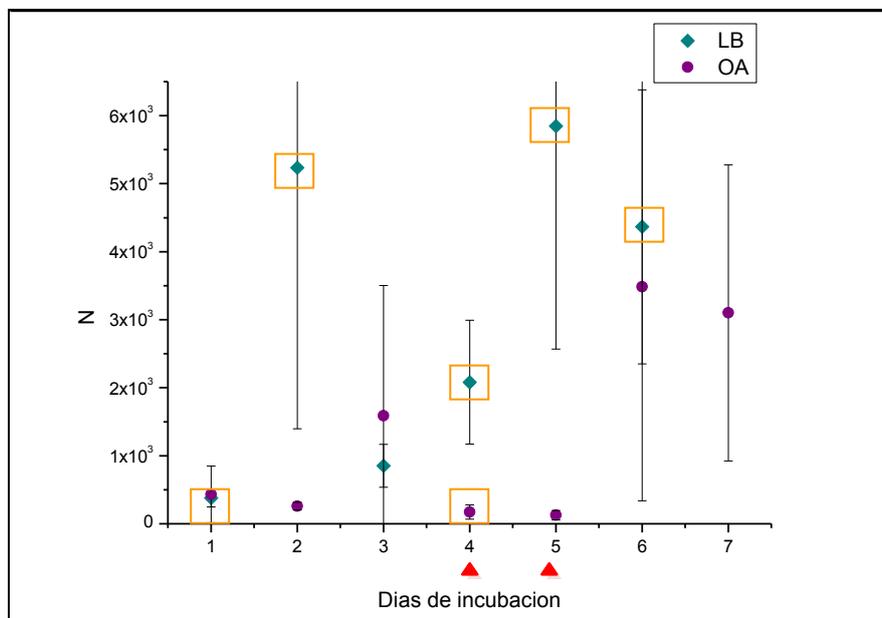


Figura 17: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial UM1. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

A4 (mutante en fimbrias ATF)

En el caso de A4, el número de bacterias mostró un aumento significativo del día 2 a 3 de incubación en LB, pero disminuyó significativamente entre el tercer y cuarto día, así como entre el quinto y el sexto. En OA el parámetro también aumentó significativamente entre los días 2 y 3, pero a diferencia de lo que se observó en LB volvió a mostrar un aumento significativo entre el 6to y 7mo día de incubación (Figura 18).

Hasta el cuarto día de incubación en OA se observó un aumento en la cantidad de bacterias de A4, aunque el mismo sólo fue significativo al tercer día. El parámetro disminuyó los días 5 y 6, aunque estos cambios no fueron significativos, y aumentó significativamente en el último día de incubación en OA.

El parámetro resultó significativamente mayor que el de la cepa salvaje Pr2921 los días 1, 2 y 4 de incubación en LB, pero significativamente menor el sexto día. En OA el número de bacterias fue significativamente mayor al de Pr2921 el tercer día de incubación (Figura 18).

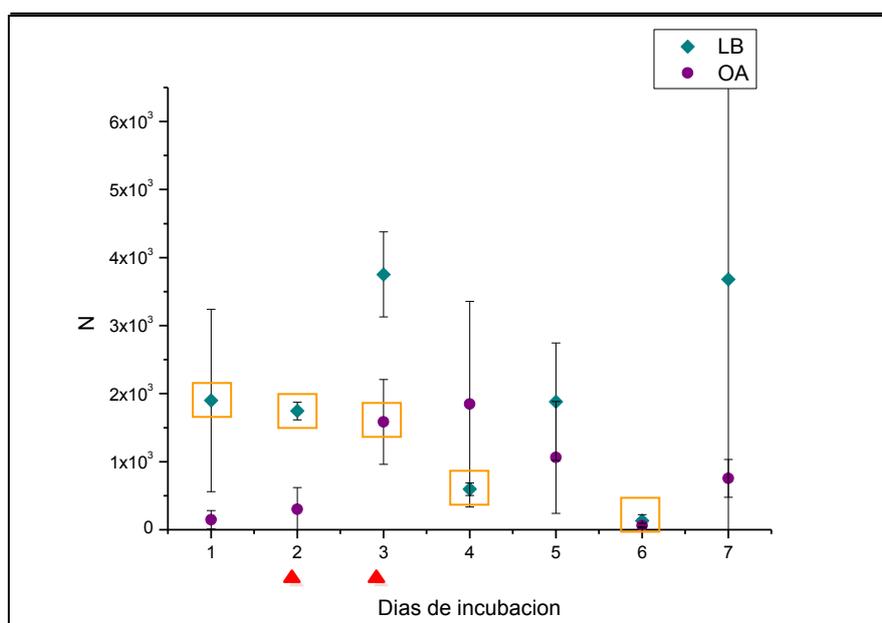


Figura 18: Gráfica de número de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial A4. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

ANEXO II

Volumen total de bacterias

El volumen total de bacterias de cada campo se calculó sumando el volumen individual de cada bacteria presente en el mismo. Los gráficos de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación representan los valores promedio y desvíos estándar para cada condición (Figuras 19 a 24).

Pr2921 (Cepa salvaje)

El volumen de bacterias de la cepa salvaje se mantuvo constante hasta el tercer día de incubación en LB, cuando se observó un aumento significativo en el mismo. El cuarto día el parámetro disminuyó significativamente, para aumentar nuevamente en forma significativa al quinto día. Durante los días 6 y 7 de incubación no hubo cambios significativos (Figura 19).

En los días 1 y 3 de incubación en LB el parámetro fue significativamente mayor que en OA, mientras que en el 6to día fue significativamente menor.

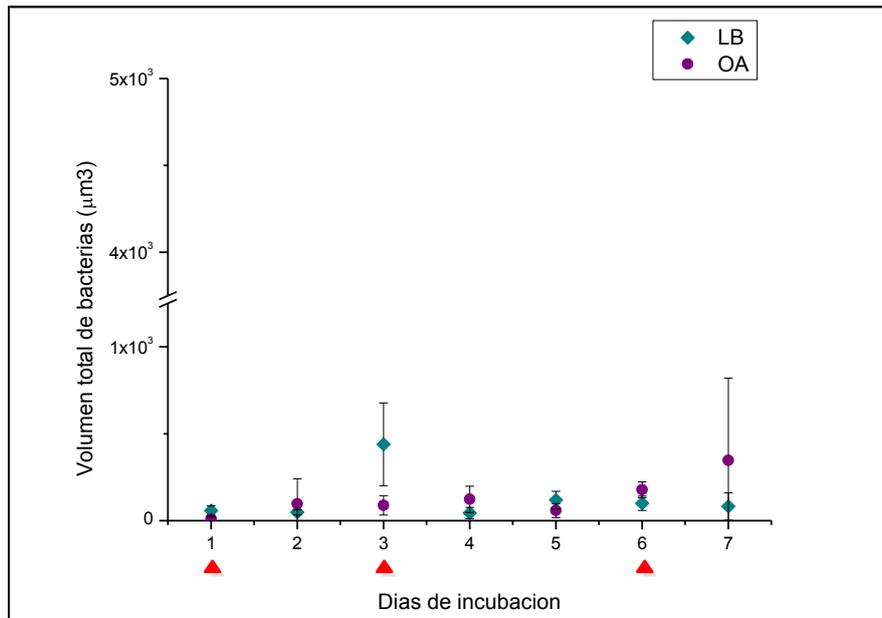


Figura 19: Gráfica de volumen ocupado de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa salvaje Pr2921. Los días en los que se observaron diferencias significativas en el parámetro en LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

AF (mutante flagelar)

El volumen total de bacterias de AF aumentó significativamente al segundo día de incubación en LB para disminuir en forma significativa al tercer día. El parámetro se mantuvo constante durante el cuarto y quinto día de incubación y aumentó nuevamente en forma significativa el sexto día. En OA no hubo cambios significativos hasta el sexto días de incubación, cuando el volumen total de bacterias disminuyó significativamente (Figura 20).

El parámetro resultó significativamente mayor en LB con respecto a OA los días 2, 3, 5 y 6 de incubación (Figura 20).

Con respecto a la cepa salvaje, AF mostró valores significativamente mayores los días 2, 4 y 6 de incubación en LB, así como el día 6 de incubación en OA (Figura 20).

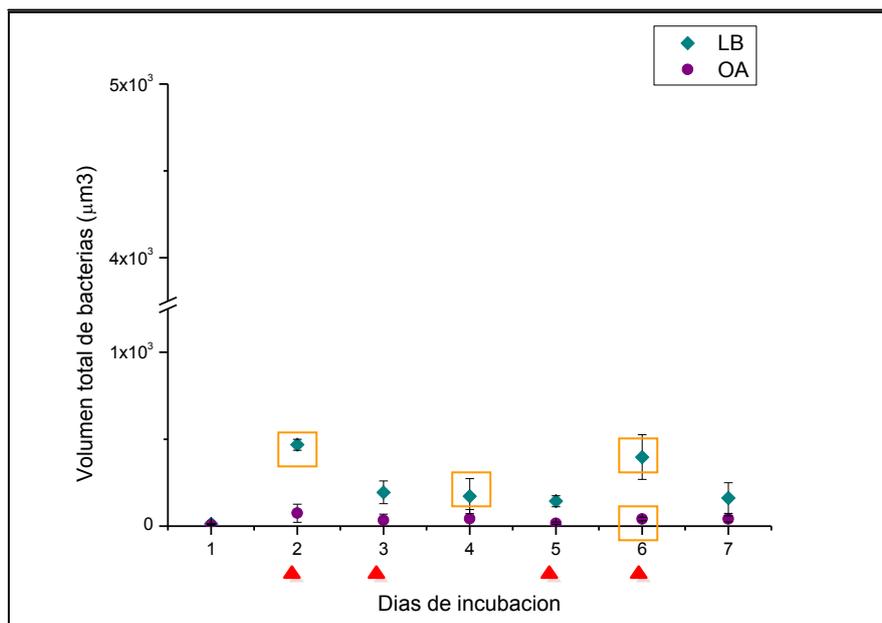


Figura 20: Gráfica de volumen ocupado de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa mutante flagelar AF. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

MSD2 (mutante en fimbrias MR/P)

El volumen total de bacterias de MSD2 aumentó significativamente entre los días 1 y 2 de incubación en LB, mientras que en OA no varió en forma significativa hasta el séptimo día, cuando se observó un aumento significativo (Figura 21).

Esta cepa no presentó diferencias significativas entre los distintos medios de cultivo (Figura 21).

Por otro lado, MSD2 mostró valores significativamente menores a los de Pr2921 los días 1, 3 y 5 de incubación en LB, así como el día 6 de incubación en OA (Figura 21).

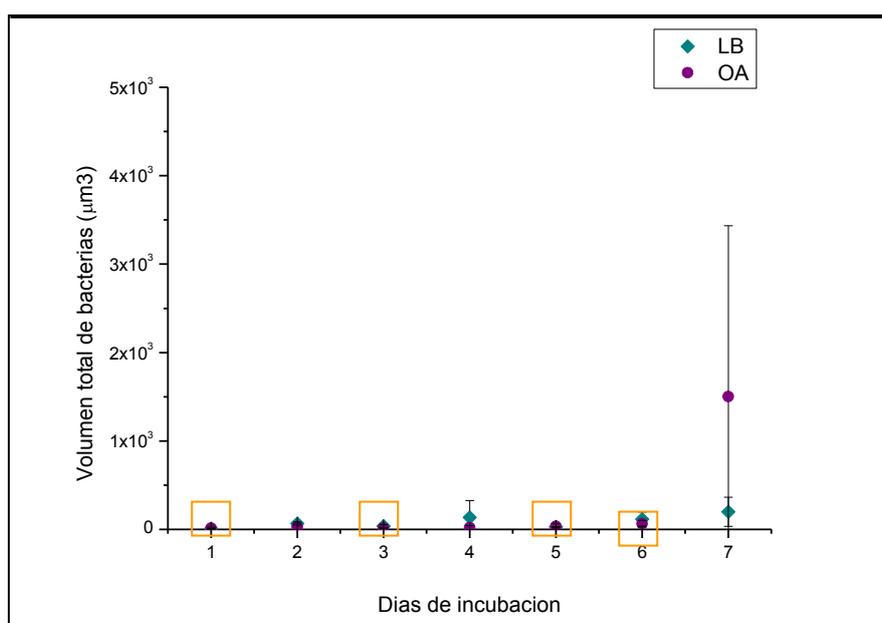


Figura 21: Gráfica de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para el mutante fimbrial MSD2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921.

P2 (mutante en fimbrias PMF)

En el caso de P2, se observó un aumento significativo en el valor del parámetro del día 1 a 2 de incubación en LB, aunque disminuyó significativamente del día 2 a 3. Por otro lado, en OA el volumen total de bacterias se mantuvo constante hasta el séptimo día de incubación, cuando se observó una disminución significativa (Figura 22).

En el segundo día de incubación el valor del parámetro en LB fue significativamente superior que en OA para esta cepa (Figura 22).

El volumen total de bacterias de P2 fue significativamente mayor que el de Pr2921 los días 2 y 4 de incubación en LB, así como el día 5 de incubación en OA (Figura 22).

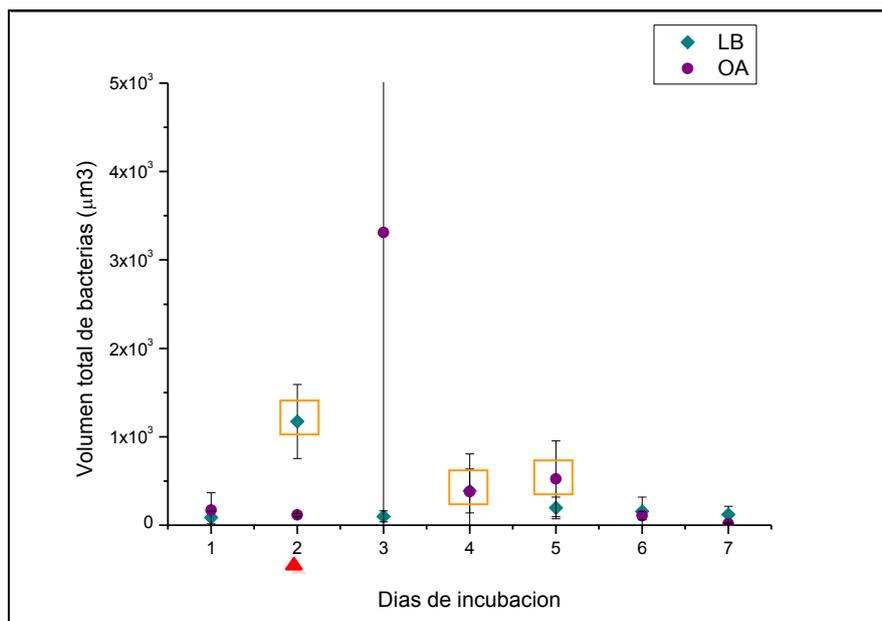


Figura 22: Gráfica de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial P2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

UM1 (mutante en fimbrias UCA)

En el caso de UM1, el volumen total de bacterias aumentó significativamente del día 1 a 2 de incubación en LB, pero disminuyó en forma significativa del día 2 al 3. En OA no se observaron diferencias significativas en este parámetro de un día al siguiente, aunque hubo variaciones en el volumen los días 6 y 7.

Con respecto a los resultados obtenidos en los distintos medios de cultivo, el valor del parámetro fue significativamente mayor en LB que en OA los días 2 y 4 de incubación.

El volumen total de bacterias de esta cepa resultó significativamente superior al de Pr2921 los días 2, 4 y 6 de incubación en LB, así como el día 1 de incubación en OA.

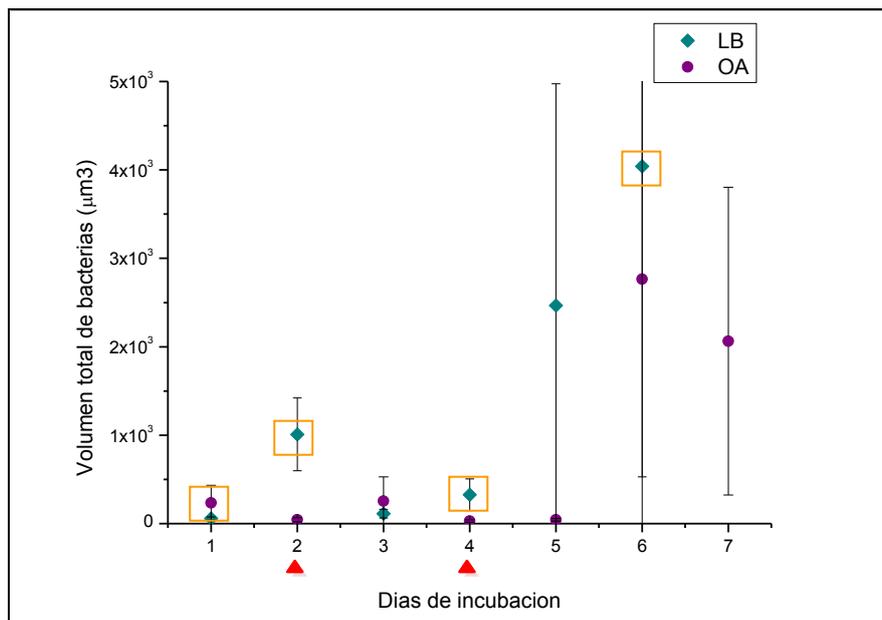


Figura 23: Gráfica de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial UM1. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

A4 (mutante en fimbrias ATF)

El volumen total de bacterias de A4 disminuyó significativamente del día 3 a 4 de incubación en LB, aumentó en forma significativa del día 4 a 5 y disminuyó nuevamente del día 5 a 6. Con respecto al cultivo en OA, se observaron aumentos significativos en el valor del parámetro de los días 2 a 3 y 6 a 7 de incubación en OA.

El parámetro fue significativamente mayor en LB que en OA los días 2 y 5 de incubación.

En comparación con la cepa salvaje, el volumen total de bacterias de A4 resultó significativamente mayor los días 1, 2, 4, 5 y 7 de incubación en LB, así como los días 3 y 6 de incubación en OA.

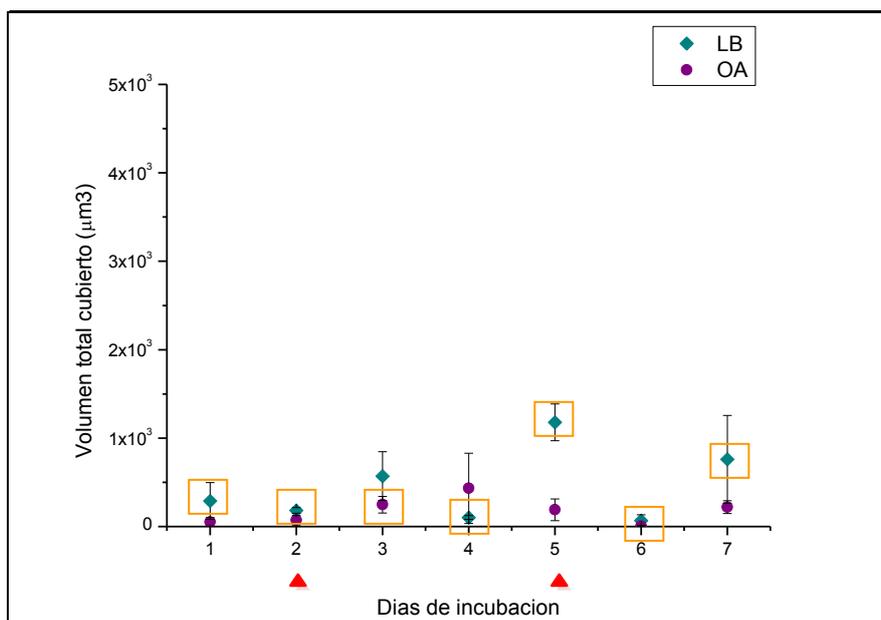


Figura 24: Gráfica de volumen total de bacterias en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial A4. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

ANEXO III

Volumen total cubierto

A partir de los valores obtenidos de volumen total cubierto de cada *stack* se calcularon el promedio y el desvío estándar para cada cepa y cada condición, y los resultados fueron graficados en función de los días de incubación (Figuras 25 a 30).

Pr2921 (Cepa salvaje)

Pr2921 mostró un aumento significativo en el volumen total cubierto entre los días 2 y 3 de incubación en LB, una disminución significativa entre los días 3 y 4 y un nuevo aumento significativo entre los días 4 y 5. En OA el parámetro aumentó significativamente del 5to al 6to día de incubación.

El volumen total cubierto resultó significativamente mayor en LB que en OA los días 1 y 5 de incubación.

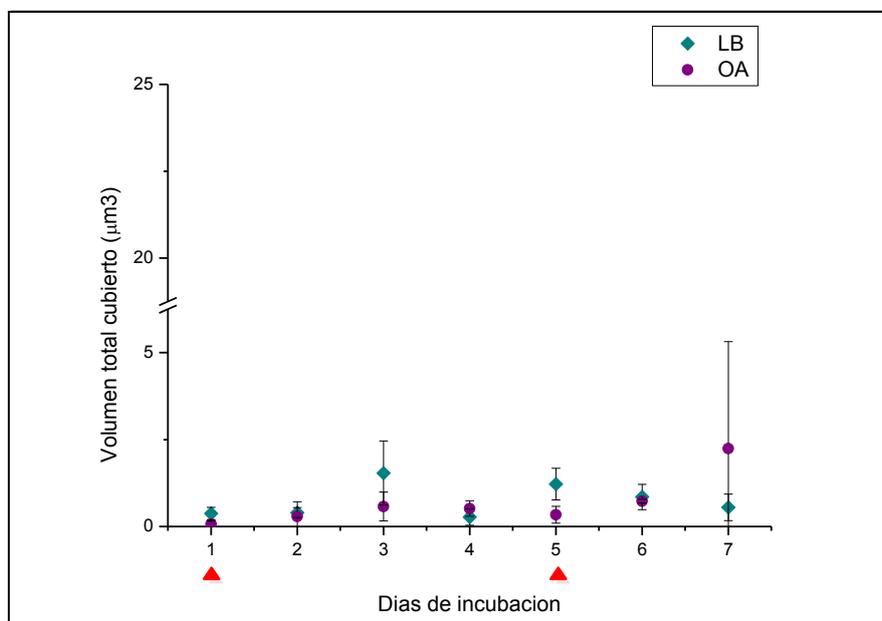


Figura 25: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa salvaje Pr2921. Los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

AF (mutante flagelar)

El valor del parámetro aumentó en forma significativa entre los días 1 y 2 de incubación en LB para esta cepa, y disminuyó significativamente del día 2 a 3, y 6 a 7 de incubación. En OA no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre un día y el siguiente.

En los días 2, 5 y 6 de incubación el volumen total cubierto de AF resultó significativamente mayor en LB que en OA.

El valor de parámetro fue significativamente menor que el de la cepa salvaje Pr2921 el primer día de incubación en LB, mientras que resultó significativamente mayor los días 2, 4 y 6. En OA el volumen total cubierto fue significativamente menor que el de la cepa salvaje en el día 6 de incubación.

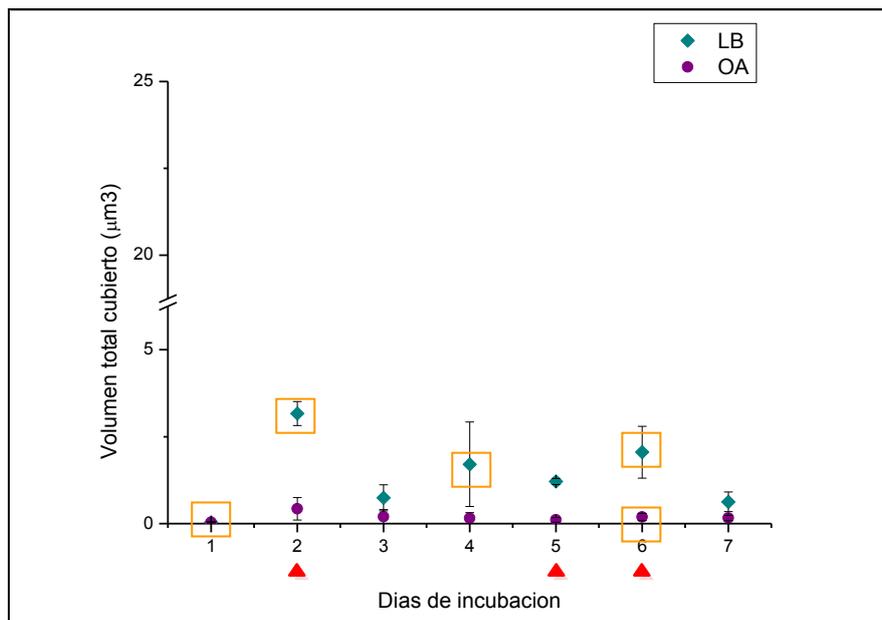


Figura 26: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la cepa mutante flagelar AF. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

MSD2 (mutante en fimbrias MR/P)

En el caso de esta cepa se observó un aumento significativo entre los días 1 y 2 de incubación en LB, y una disminución significativa del día 2 al día 3. En OA no hubo cambios significativos en el parámetro entre un día y el siguiente.

Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre un medio y otro para esta cepa.

El volumen total de bacterias de MSD2 resultó significativamente menor que el de la cepa salvaje los días 1, 5 y 6 de incubación en LB, y los días 4 y 6 de incubación en OA.

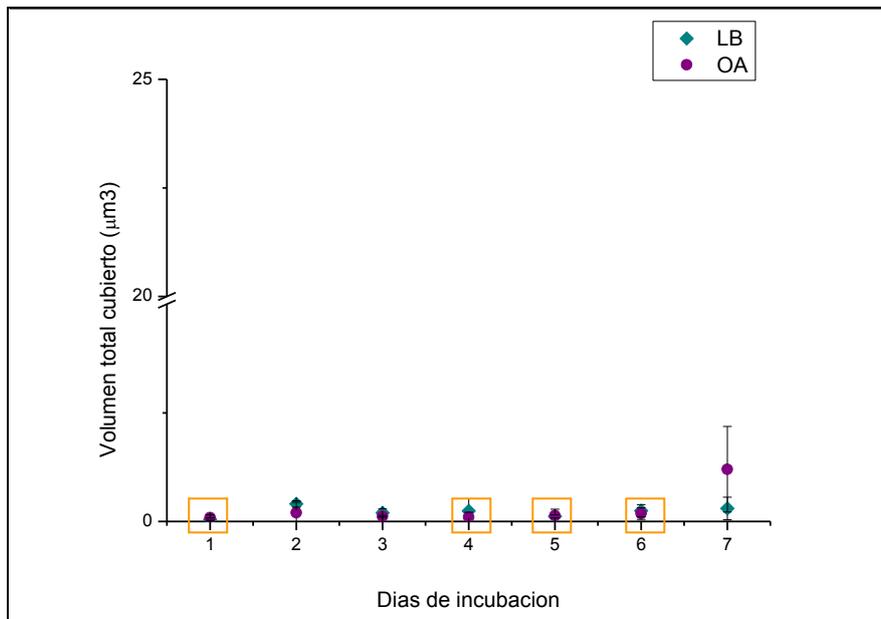


Figura 27: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial MSD2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921.

P2 (mutante en fimbrias PMF)

Se observó una disminución significativa en el volumen total cubierto entre los días 2 y 3 de incubación en LB, y del día 6 al 7 de incubación en OA.

El valor del parámetro resultó significativamente mayor en LB con respecto a OA en el segundo día de incubación.

El volumen cubierto de P2 fue significativamente mayor que el de la cepa salvaje Pr2921 los días 2, 4 y 5 de incubación en LB; en OA no se observaron diferencias significativas entre ambas cepas.

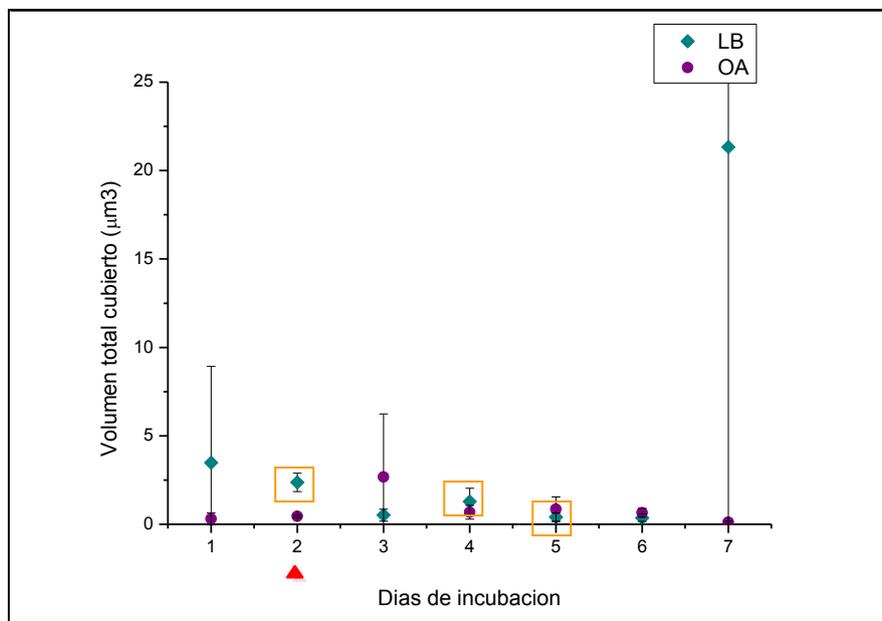


Figura 28: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial P2. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

UM1 (mutante en fimbrias UCA)

UM1 presentó un aumento significativo en el volumen total cubierto entre los días 1 y 2 de incubación en LB, mientras que el parámetro disminuyó significativamente entre los días 2 y 3. En OA no se observaron cambios significativos de un día de incubación al siguiente.

En los días 2 y 4 de incubación el volumen total cubierto fue significativamente superior cuando la cepa se cultivó en LB con respecto a cuando se cultivó en OA.

Con respecto a la cepa salvaje, el valor del parámetro resultó significativamente mayor los días 2 y 4 de incubación en LB, y el día 4 de incubación en OA.

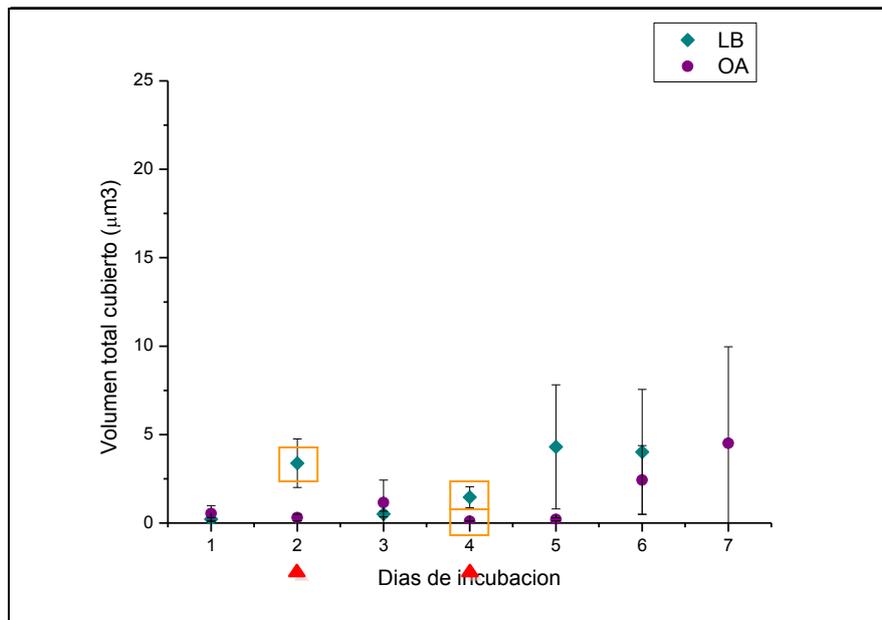


Figura 29: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial UM1. El recuadro anaranjado marca los casos donde hubo diferencias significativas respecto a la cepa salvaje Pr2921, mientras que los días en los que se observaron diferencias significativas entre LB y OA son señalados por un triángulo rojo bajo el eje x.

A4 (mutante en fimbrias ATF)

El volumen total cubierto de esta cepa aumento significativamente del día 2 a 3 de incubación en LB, y disminuyo en forma significativa entre los días 3 y 4. En OA, el valor del parámetro aumentó significativamente del día 6 al día 7 de incubación.

Los días 3 y 6 el volumen total cubierto en LB resulto significativamente mayor que en OA.

El valor del parámetro fue significativamente mayor que el de Pr2921 (cepa salvaje) los días 2 y 6 de incubación en LB, mientras que resulto significativamente menor el día 6 de incubación en OA.

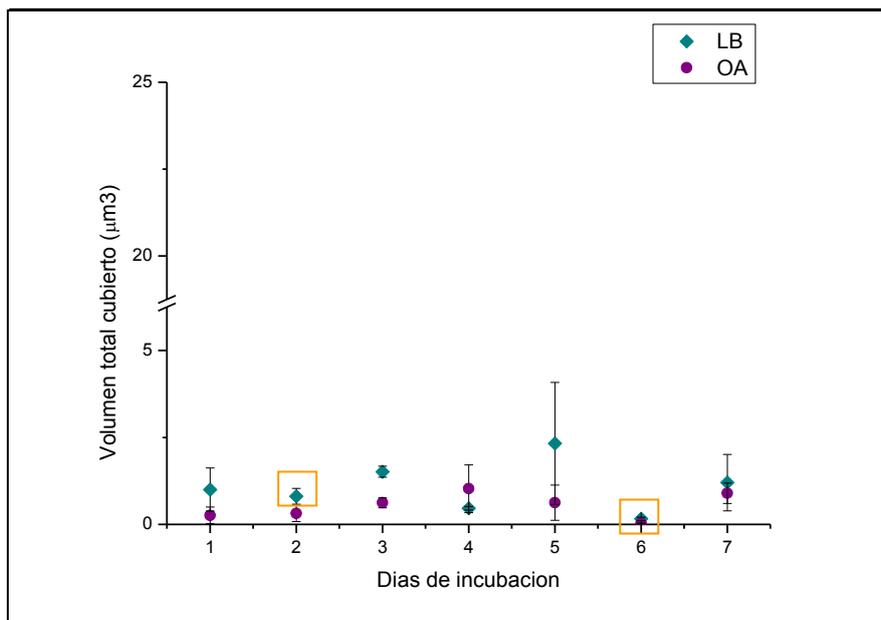


Figura 30: Gráfica de volumen total cubierto en función del tiempo de incubación en LB y OA para la mutante fimbrial A4.